

Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
Leiter: Prof. Dr. med. H. Renz

**EPIGENETISCHE REGULATION TH1/TH2-RELEVANTER GENE IN
CD4⁺-T-ZELLEN ALS MECHANISMUS DER ALLERGIE-PRÄVENTION
BEI EXPERIMENTELLEM ASTHMA**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
(Dr. rer. physiol.)



Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg vorgelegt von

STEPHANIE BRAND

geb. in Marburg/Wehrda

Marburg,
2010

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg am:
15.06.2010

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. M. Rothmund

Referent: PD Dr. rer. nat. Holger Garn

Koreferent: Prof. Dr. med. M. Lohoff

*„WISSENSCHAFT IST NUR AUSTAUSCH UNSERER UNWISSENHEIT
GEGEN UNWISSENHEIT NEUER ART.“*

George Gordon Lord Byron

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	7
1.1	ALLERGISCHE ERKRANKUNGEN – EPIDEMIEN DES 21. JAHRHUNDERTS.....	7
1.2	ASTHMA BRONCHIALE	7
1.2.1	<i>Mechanismen.....</i>	8
1.2.2	<i>T-Zell-Immunantwort: Die verschiedenen T-Helfer-Zellen.....</i>	13
1.3	EPIDEMIOLOGIE DES ASTHMA BRONCHIALE	14
1.3.1	<i>Risikofaktoren</i>	15
1.3.2	<i>Protektive Faktoren – die Rolle mikrobieller Stimuli.....</i>	17
1.4	EPIGENETIK	19
1.4.1	<i>DNA-Methylierung</i>	20
1.4.2	<i>Der Histon Code – Histonmodifikationen</i>	21
1.4.3	<i>Epigenetische Regulation der Th1/Th2-Differenzierung.....</i>	23
1.4.3.1	<i>Der IFNγ-Lokus.....</i>	24
1.4.3.2	<i>Der Th2-Lokus</i>	26
1.5	FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	28
2	MATERIAL UND METHODEN.....	30
2.1	VERSUCHSTIERE UND VERSUCHSTIERHALTUNG	30
2.2	INDUKTION EINER ALLERGISCHEN ATEMWEGSENTZÜNDUNG	30
2.3	MODULATION DER ALLERGISCHEN ATEMWEGSENTZÜNDUNG DURCH DAS DEMETHYLIERUNGSREAGENZ 5-AZA-2'-DEOXYCYTIDIN	31
2.4	PRÄNATALE IMMUNMODULATION	32
2.5	<i>EX VIVO UND IN VIVO PROLIFERATIONSASSAY MITTELS CFSE.....</i>	34
2.6	HEAD-OUT BODY-PLETHYSMOGRAPHIE	34
2.7	BRONCHO-ALVEOLÄRE LAVAGE (BAL)	35
2.7.1	<i>Zellzählung und Differenzierung von Leukozytensubpopulationen.....</i>	36
2.8	LUNGENHISTOLOGIE	36
2.9	BLUTABNAHME UND SERUMGEWINNUNG	37
2.10	MAY-GRÜNWARD-GIEMSA-FÄRBUNG VON BLUT AUSSTRICHEN.....	38
2.11	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON OVA-SPEZIFISCHEM IGE, IGG ₁ UND IGG _{2A} SOWIE VON GESAMT IGE IM SERUM MITTELS ENZYME-LINKED IMMUNOSORBANT ASSAY (ELISA)	38
2.11.1	<i>Immunglobulin-ELISA.....</i>	39
2.12	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON ZYTOKINEN AUS ÜBERSTÄNDEN VON LYPHOZYTENKULTUREN MITTELS ELISA.....	40
2.12.1	<i>Gewinnung primärer Zellen aus Milz und Lymphknoten</i>	40
2.12.2	<i>Isolierung von mononukleären Zellen</i>	41
2.12.3	<i>Kurzzeitstimulation der MNCs</i>	41
2.12.4	<i>Zytokin-ELISA</i>	42
2.13	FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTING (FACS)	43
2.13.1	<i>Oberflächenfärbung</i>	44

2.13.2	<i>Foxp3-Intrazellulär-Färbung</i>	44
2.14	CFSE PROLIFERATIONSASSAY	45
2.15	ZELLSEPARATION MITTELS MAGNET-BEAD-TECHNOLOGIE	46
2.15.1	<i>CD4⁺-T-Zellen aus der Milz</i>	46
2.15.2	<i>CD4⁺CD25⁻-T-Zellen aus der Milz</i>	46
2.16	BESTIMMUNG DES CPG-METHYLIERUNGSGRADES GENOMISCHER DNA	47
2.16.1	<i>Pyrosequenzierung</i>	47
2.16.1.1	Bisulfit-Konversion genomischer DNA	48
2.16.1.2	Amplifikation der Bisulfit-DNA	49
2.16.1.3	Pyrosequenzierung	51
2.16.2	<i>Luminometric Methylation Assay</i>	52
2.17	CHROMATIN-IMMUNO-PRÄZIPITATION (CHIP)	53
2.18	NACHWEIS VON GENEXPRESSION AUF mRNA-EBENE	58
2.18.1	<i>RNA-Isolierung</i>	58
2.18.2	<i>DNase-Verdau</i>	59
2.18.3	<i>RNA-Quantifizierung</i>	59
2.18.4	<i>Reverse Transkription</i>	60
2.19	QUANTITATIVE POLYMERASE-KETTEN-REAKTION (QPCR)	60
2.20	PRIMER	62
2.21	STATISTISCHE AUSWERTUNG	63
3	ERGEBNISSE	64
3.1	EINFLUSS VON DNA-METHYLIERUNG AUF DEN ASTHMATISCHEN PHÄNOTYP IM TIERMODELL DER AKUTEN ATEMWEGSENTZÜNDUNG	64
3.1.1	<i>Zytotoxizität von 5-Aza-2'-Deoxycytidin - Dosisfindung</i>	64
3.1.2	<i>Inhibition der DNA-Methylierung durch 5-Aza-2'-Deoxycytidin</i>	67
3.1.3	<i>Pharmakologische DNA-Demethylierung durch 5Aza führt zu einer Prävention des asthmatischen Phänotyps im Mausmodell des experimentellen Asthmas</i>	68
3.1.3.1	DNA-Methylierung Th1- und Th2-spezifischer Genregionen ist nach 5Aza-Behandlung unterschiedlich stark beeinflusst	73
3.1.4	<i>Der Methylierungsgrad CD4⁺-T-Zellen spielt eine entscheidende Rolle für die Induktion der allergischen Atemwegsentzündung</i>	75
3.2	EPIGENETISCHE REGULATION DER ASTHMAPROTEKTION DURCH DAS APATHOGENE BAKTERIUM <i>ACINETOBACTER LWOFFII</i> F78	81
3.2.1	<i>Pränatale A. lwoffii F78-Exposition beeinflusst die Th1/Th2-Balance</i>	81
3.2.2	<i>Die Asthma-Protektion durch pränatale A. lwoffii F78-Exposition ist abhängig von der erhöhten IFNγ-Produktion in den Nachkommen</i>	81
3.2.3	<i>Epigenetische Regulation nach pränataler A. lwoffii F78-Exposition</i>	85
3.2.3.1	Pränatale A. lwoffii F78-Exposition beeinflusst H4-Acetylierung, aber nicht DNA- Methylierung am IFN γ -Promotor	85
3.2.3.2	Pränatale A. lwoffii-Exposition führt zur epigenetischen Modulation am IL-4-Promotor sowie an einer übergeordneten genregulatorischen Region (CNS-1) des Th2-Lokus	88

3.2.4	<i>Inhibition der Histonacetylierung durch den Histonacetyltransferase-Inhibitor Garcinol verhindert A. Iwoffii F78-vermittelte Asthma-Protektion in den Nachkommen</i>	91
4	DISKUSSION	97
4.1	INHIBITION DER DNA-METHYLIERUNG BEEINFLUSST ALLERGISCHE SENSIBILISIERUNG UND PHÄNOTYP IM TIERMODELL DES EXPERIMENTELLEN ASTHMAS	99
4.1.1	<i>Systemische 5Aza-Behandlung reduziert den asthmatischen Phänotyp im Tiermodell</i>	101
4.1.2	<i>Differenzielle Demethylierung nach 5Aza-Behandlung</i>	102
4.1.3	<i>Epigenetische Signatur von T-Zellen ist essentiell für Sensibilisierung und Phänotyp des experimentellen Asthmas</i>	104
4.1.4	<i>Fazit</i>	105
4.2	TRANSMATERNALE ASTHMAPROTEKTION IN DEN NACHKOMMEN DURCH VERÄNDERTE HISTON H4-ACETYLIERUNG AM IFN γ -PROMOTOR	106
4.2.1	<i>Pränatale A. Iwoffii F78-Exposition führt zur Verschiebung der Th1/Th2-Balance</i>	107
4.2.2	<i>A. Iwoffii F78-vermittelte Asthma-Reduktion ist assoziiert mit epigenetischer Modifikation in CD4⁺-T-Zellen</i>	109
4.2.3	<i>H4-Acetylierung vermittelt erhöhte IFNγ-Produktion und reduzierten asthmatischen Phänotyp</i>	111
4.2.4	<i>Faktoren, die zur mikrobiell-vermittelten Asthmaprotektion beitragen könnten</i>	112
4.2.5	<i>Fazit</i>	113
5	ZUSAMMENFASSUNG	115
5.1	SUMMARY.....	116
6	LITERATURVERZEICHNIS	119
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	134
8	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	137
8.1	ABBILDUNGEN	137
8.2	TABELLEN	138
9	VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER	139
10	PUBLIKATIONEN	140
11	DANKSAGUNG	142

1 EINLEITUNG

1.1 Allergische Erkrankungen – Epidemien des 21. Jahrhunderts

Die Aufgabe des Immunsystems ist es, den Organismus vor potentiell gefährlichen Agentien zu schützen. Um diese Aufgabe ausführen zu können, unterliegt es einer komplexen Regulation, die für eine adäquate Reaktion auf „fremde“ bzw. „selbst“ Antigene verantwortlich ist. Allergische Erkrankungen stellen eine Störung dieser komplexen Regulationsmechanismen dar und sind durch eine Immunantwort auf ein normalerweise harmloses Umweltantigen charakterisiert. Der Allergenkontakt löst hier eine akute Entzündungsreaktion aus, die für die oft heftige Symptomatik allergischer Erkrankungen verantwortlich ist. Allergische Reaktionen werden in vier Typen eingeteilt, wobei die häufigste Überempfindlichkeitsreaktion die Sofortreaktion vom Typ I ist, wie sie z.B. bei der allergischen Rhinokonjunktivitis und dem allergischen Asthma bronchiale vorliegt.

1.2 Asthma bronchiale

Asthma bronchiale ist eine chronische Erkrankung der Atemwege, an deren Entstehung sowohl genetische Faktoren (genetische Prädisposition), als auch Umwelteinflüsse beteiligt sind. Daher wird es in die Kategorie der komplexen multifaktoriellen Erkrankungen eingeordnet (Barnes 1999, Cooksen 1999). Bis heute existiert keine genau umrissene, allgemein akzeptierte Definition des Asthma bronchiale, was unter anderem an den verschiedenen klinischen Erscheinungsformen und variablen Schweregraden liegt, mit denen diese Krankheit auftritt. Die Anamnese kann von Patient zu Patient stark variieren und die Symptome können vorübergehend sein, periodisch auftreten oder persistieren (Fireman 2003). Gängige „Definitionen“ stellen daher eher Symptombeschreibungen dar. Die „globale Initiative für Asthma (GINA)“ (Bateman 2008) und das „National Heart, Blood and Lung Institute“ (EPR-3 2007) beschreiben Asthma demnach wie folgt:

„Asthma bronchiale ist eine chronisch entzündliche Erkrankung der Atemwege, bei der eine Vielzahl von Zellen und zellulären Faktoren eine Rolle spielen, insbesondere Mastzellen, eosinophile Granulozyten, T-Lymphozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und epitheliale

Zellen. Bei prädisponierten Individuen ruft die chronische Entzündung wiederkehrende Episoden mit Luftnot, Engegefühl der Brust und Husten, besonders nachts und/oder am frühen Morgen hervor. Diese Symptome sind gewöhnlich assoziiert mit Limitationen des Luftstroms, die zumindest teilweise spontan oder durch Behandlung reversibel sind. Die chronische Entzündung ruft auch eine erhöhte Reaktionsbereitschaft der Atemwege auf variable Stimuli hervor.“

Dem allergischen Asthma bronchiale liegt zumeist eine Sensibilisierung gegenüber luftgetragenen Allergenen zugrunde. Es wird in der Regel durch eine in den Bronchien auftretende IgE-vermittelte Hypersensibilitätsreaktion vom Typ I (Soforttyp) ausgelöst, die normalerweise in Zusammenhang mit einer Allergenexposition auftritt. Das allergische Asthma manifestiert sich meist im Kindes- oder Jugendalter, wobei die Betroffenen häufig noch weitere atopische Erkrankungen, wie atopisches Ekzem oder Rhinitis aufweisen (Johansson 2001). Weiterhin findet sich häufig eine positive Familienanamnese für atopische Krankheiten. Unter dem Begriff Atopie (griech. „atopos“ = ungewöhnlich) werden dabei alle Krankheiten allergischen Charakters zusammengefasst, bei denen man aufgrund einer genetischen Prädisposition dazu neigt, auf minimale Konzentrationen natürlicher Allergene mit einer IgE-vermittelten Hypersensibilitätsreaktion vom Typ I zu reagieren. Neben spezifischen IgE-Antikörpern kann im Serum von Atopikern in der Regel auch ein erhöhter Gesamt-IgE-Spiegel und eine stark erhöhte Konzentration an eosinophilen Granulozyten gemessen werden (Cooksen 2004).

1.2.1 Mechanismen

Untersuchungen zeigen, dass die für Asthma charakteristische Atemwegsobstruktion auf verschiedenen Ursachen beruht. Hier sind zu nennen: akute Bronchoobstruktion, Anschwellen der Atemwege, chronische Bildung von Schleimpfropfen und der charakteristische Umbau der Atemwege, ein allgemein als „airway remodeling“ bezeichneter Prozess. Die diesen pathologischen Veränderungen zugrunde liegenden Vorgänge sind sehr komplex und umfassen sowohl humorale, als auch zelluläre Mechanismen, die im Folgenden beschrieben werden.

Sensibilisierung

Am Anfang der Karriere eines Allergikers steht die Sensibilisierungsphase, die durch den ersten Kontakt mit dem jeweiligen Allergen eingeleitet wird. In sensibilisierten Individuen führt dann ein erneuter Kontakt mit demselben Allergen zu einer allergischen Reaktion.

Einer der frühesten Schritte in der Etablierung einer allergischen Sensibilisierung ist die Generation einer antigenspezifischen T-Zell-Antwort gegen das jeweilige Allergen. Diese resultiert aus einer Aktivierung von T-Zellen durch allergenbeladene Antigen-präsentierende Zellen (APC), wobei es sich primär um Dendritische Zellen (DC) handelt (Mellman 2001). Ein Netzwerk von DCs befindet sich unter dem Atemwegsepithel, wo sie gewissermaßen eine Überwachungsfunktion übernehmen und direkt mit inhalierten Allergenen in Kontakt treten, diese aufnehmen und prozessieren können (Huh 2003, Galli 2008). Die so stimulierten DCs migrieren anschließend in die drainierenden Lymphknoten (LK) der Lunge (Vermaelen 2003) und präsentieren über ihre Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex II (MHCII)-Moleküle die prozessierten Allergene/Antigene naiven Th0-Zellen (Stirling 2000). Durch die Bindung des Antigen-MHCII-Komplexes an den T-Zell-Rezeptor (TCR), in Verbindung mit einem zusätzlichen kostimulatorischen Signal, welches durch die Interaktion zwischen B7-2 auf der Zelloberfläche der APCs und CD28 auf der Zelloberfläche der Th0-Zellen vermittelt wird, werden die Th0-Zellen aktiviert und differenzieren sich selektiv zu reifen Th2-Zellen (Lohoff 2005, Murphy 2002, Stirling 2000). Dieser als „Priming“ bezeichnete Vorgang hängt maßgeblich von dem Zytokinmilieu ab, in dem er stattfindet. So ist das Vorhandensein des Zytokins IL-4 essentiell für die selektive Differenzierung zu Th2-Zellen und deren Proliferation (Lohoff 2005, Stirling 2000). Weiterhin scheint IL-13 diesen Prozess zusätzlich zu begünstigen (Marone 1998, McKenzie 2000).

Aktivierte Th2-Zellen produzieren ihrerseits eine Reihe von Zytokinen wie IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, IL-25, IL-33 und den Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) (Romagnani 2000, Nakajima 2007), wobei IL-4 und IL-13 die wichtigsten Zytokine in diesem Zusammenhang darstellen. Neben dem bereits erwähnten Einfluss dieser Zytokine auf die Th2-Differenzierung, ist eine weitere wichtige Funktion, dass sie in aktivierten B-Zellen einen Klassenwechsel („isotype-switch“) zu IgE induzieren (Geha 2003, Wills-Karp 2004). Dies resultiert in der vermehrten Sezernierung allergenspezifischer IgE-Antikörper, welche nach kurzer Zirkulation im Blut an hochaffine IgE-Rezeptoren (Fc_εRI) auf der Oberfläche von alveolären Mastzellen binden, wodurch diese sensibilisiert werden (Barnes 2008, Galli 2008) (Abb. 1.1).

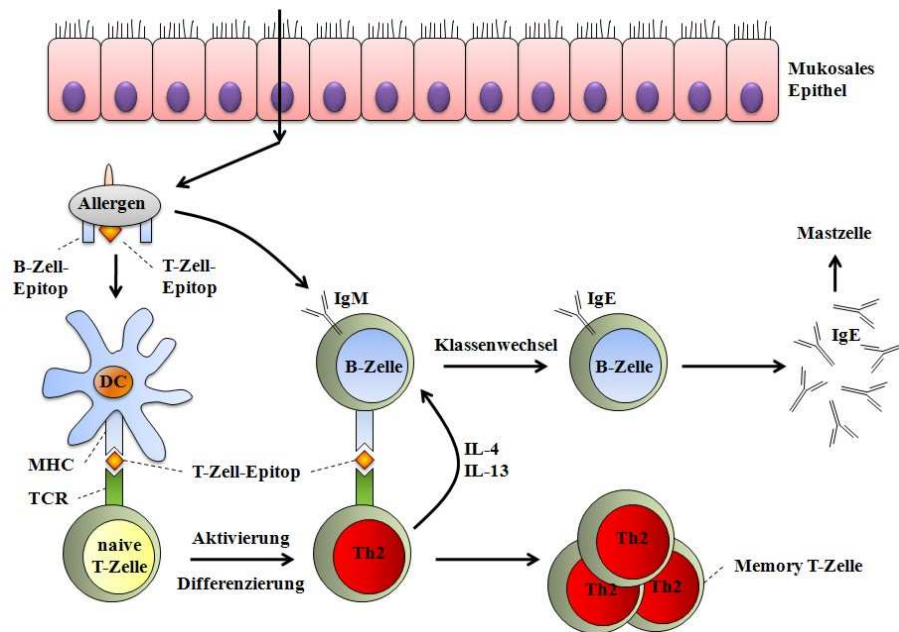


Abb. 1.1 Sensibilisierungsphase (modifiziert nach Valenta 2002)

Allergene werden von DCs aufgenommen und prozessiert. Die aktivierten DCs migrieren in die regionalen Lymphknoten, wo sie Peptide des Allergens naiven T-Zellen präsentieren. Diese werden aktiviert und differenzieren in Anwesenheit von frühem IL-4 zu Th2-Zellen, deren Zytokine einen Klassenwechsel zu IgE in B-Zellen auslösen. Das IgE wird über Lymphe und Blut systemisch verteilt und bindet an hochaffine IgE-Rezeptoren (Fc_εRI) auf Mastzellen im Gewebe. Diese Zellen sind nun sensibilisiert um bei einer späteren Reexposition mit dem Allergen zu reagieren. Die Sensibilisierung selbst führt zu keinerlei Symptomen.

Sofortreaktion

Nach erfolgter Sensibilisierung führt ein wiederholter Allergenkontakt zur Ausbildung einer Sofortreaktion innerhalb weniger Minuten nach Exposition. Hier kommt es zur Interaktion von Allergenen und dem membranständigen hochaffinen IgE-Fc_εRI-Komplex auf Mastzellen und damit zu einer Kreuzvernetzung der Rezeptoren (Holt 1999, Galli 2008). Dies leitet wiederum die Degranulation der Mastzellen ein und es kommt zur Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren wie Histaminen, Prostaglandinen, Leukotrienen und reaktiven Sauerstoffderivaten, sowie einer Reihe von proteolytischen und glykolytischen Enzymen (Holgate 1993, Galli 2008). Diese ausgeschütteten Mediatoren induzieren eine schnelle Kontraktion der glatten Atemwegsmuskulatur (akute Bronchokonstriktion) als dem charakteristischen Symptom der Sofortreaktion (Bousquet 2000, Galli 2008), was wiederum eine Verengung der Atemwege zur Folge hat. Die freigesetzten Mediatoren tragen aber auch zu einigen Symptomen der Spätreaktion bei, wie der verstärkten Schleimproduktion, der Erweiterung der Blutgefäße (Vasodilatation) und der Rekrutierung von Entzündungszellen (Holt 1999, Galli 2008) (Abb. 1.2).

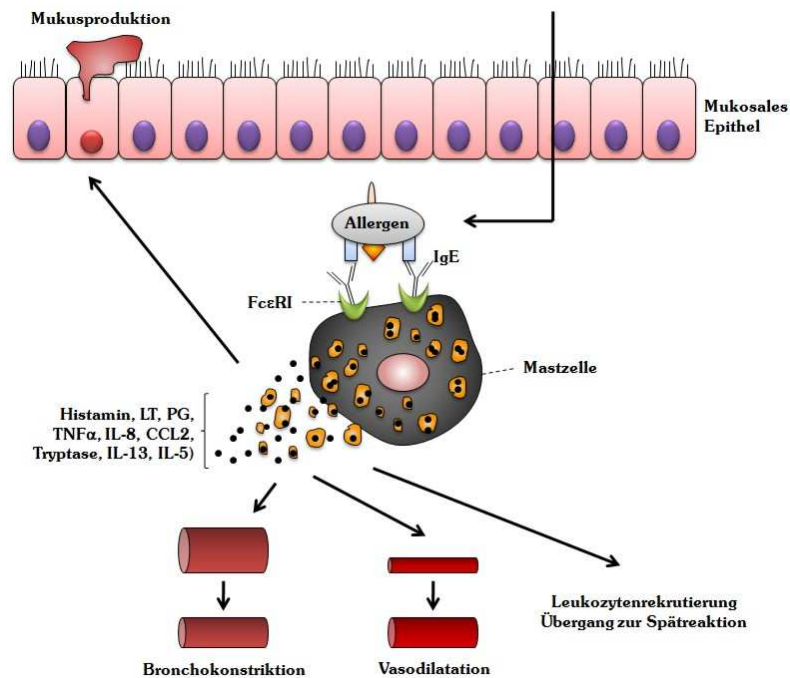


Abb. 1.2 Sofortreaktion (modifiziert nach Valenta 2002, Galli 2008)

Durch die Erkennung von Allergenen mittels $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ -gebundenem spezifischem IgE auf Mastzellen, kommt es zur Kreuzvernetzung der Rezeptoren, was zur Aktivierung der Zellen führt und zur sofortigen Freisetzung vorgebildeter inflammatorischer Mediatoren durch Degranulation. Dies bewirkt Bronchokonstriktion, Vasodilatation und erhöhte Mucusproduktion. Weiterhin wird die Spätreaktion durch die Rekrutierung von Leukozyten ins Gewebe eingeleitet.

Spätreaktion

Der Sofortreaktion schließt sich in den meisten Fällen eine allergische Spätreaktion an, die sechs bis neun Stunden nach dem Allergenkontakt einsetzt (Galli 2008, Bousquet 2000). Als charakteristisches Merkmal dieser Phase gilt die Rekrutierung von inflammatorischen Zellen aus dem Blutkreislauf in die Atemwege und deren Aktivierung. Hier stellen eosinophile Granulozyten die Haupteffektoren der Spätreaktion dar, da auch die meisten nicht-allergischen Asthmatiker eine bronchiale Eosinophilie aufweisen (Bousquet 2000). Aktivierte eosinophile Granulozyten schütten ein großes Spektrum an Mediatoren aus, wie z.B. freie Sauerstoffradikale, Leukotriene, Plättchen-aktivierender-Faktor (PAF), Major-Basic-Protein (MBP), GM-CSF, Eotaxin und eosinophile Peroxidase, aber auch Th2-Zytokine wie IL-4, IL-5 und IL-13, sowie einige Wachstumsfaktoren (Fireman 2003, Cohn 2004). Die Folgen dieser, zunächst akuten, Entzündung sind Kontraktionen der glatten Atemwegsmuskulatur (Rabe 1994), Beschädigung und Ablösung der bronchialen Epithelzellen, verstärkte Schleimbildung (Cohn 2004), bronchiale Hyperreaktivität (Leff 1994, Fireman 2003), erhöhte vaskuläre Permeabilität (Collins 1993) und Bildung mikrovaskulärer Lecks. Letztere führen zu einem Schleimhautödem, was wiederum eine Verdickung der Atemwegswand zur Folge hat (Abb. 1.3). Bei einer länger andauernden,

schweren oder chronischen Entzündung kommt es zu charakteristischen strukturellen Veränderungen, die mit einem Umbau der Atemwege, dem „airway-remodeling“ einhergehen. Pathologische Merkmale des „airway-remodeling“ sind Hypertrophie und Hyperplasie der glatten Muskelzellen, Metaplasie der Becherzellen, sowie eine Verdickung der epithelialen Basalmembran (Vignola 2003, Bergeron 2006).

Eine weitere Schlüsselrolle bei der Initiierung, Dirigierung und Aufrechterhaltung der Entzündung, neben den eosinophilen Granulozyten, spielen aktivierte Th2-Zellen und die von ihnen sezernierten Zytokine (Cohn 2004, Nakajima 2007). Hier ist als wichtigstes Zytokin IL-5 zu nennen, da es die Differenzierung und das Wachstum von eosinophilen Granulozyten fördert, weiterhin ihre Überlebenszeit erhöht und ihre Rekrutierung in die Atemwege, sowie die Expression ihrer Adhäsionsmoleküle beschleunigt. Neben IL-5 sind aber auch weitere Th2-Zytokine (IL-4, IL-9 und IL-13) von Bedeutung, da sie die Becherzellmetaplasie und damit Mukushypersekretion fördern, als auch das Wachstum von Mastzellen. Weiterhin inhibieren diese Zytokine die Entwicklung von Th1-Zellen und unterstützen damit Th2-assoziierte allergische Immunantworten (Romagnani 2000, Galli 2008) (Abb. 1.3).

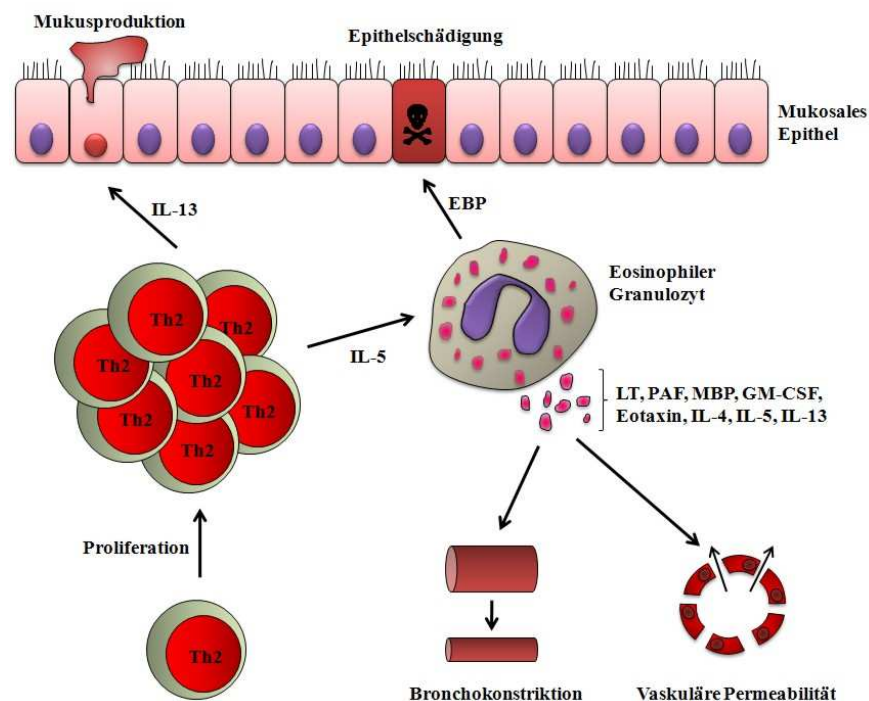


Abb. 1.3 Spätreaktion (modifiziert nach Valenta 2002, Galli 2008)

Die Spätreaktion teilt viele Merkmale der Sofortreaktion, tritt typischerweise aber erst Stunden nach Allergenkontakt auf und spiegelt die Aktionen der ins Gewebe rekrutierten Immunzellen (z.B. eosinophile Granulozyten, Th2-Zellen) wieder. Diese produzieren eine Reihe von Mediatoren und Zytokinen, die zu Bronchokonstriktion, erhöhter Mukusproduktion, erhöhter vaskulärer Permeabilität sowie zu einer Schädigung des mukosalen Epithels führen.

Die genauen Mechanismen, die zur Aufrechterhaltung und Chronifizierung der Entzündung führen sind noch weitgehend unklar. Postuliert wird, dass eine wiederholte Aktivierung von Th2-Zellen durch eine mehrmalige bzw. ständige Allergenexposition das zentrale Ereignis für die Entwicklung einer chronischen Entzündung darstellt (Galli 2008). Einmal initiiert, scheint eine Art Selbsterhaltungsprozess einzutreten, da auch aktivierte eosinophile Granulozyten IL-5 sezernieren (Bousquet 2000). Weiterhin scheinen auch beschädigte Epithelzellen an der Aufrechterhaltung der Entzündung beteiligt zu sein. Sie sezernieren eine Reihe von Zytokinen, Enzymen und Wachstumsfaktoren, die ebenfalls zur Rekrutierung und Verlängerung der Lebenszeit inflammatorischer Effektorzellen beitragen (Levine 1995, Fireman 2003).

1.2.2 T-Zell-Immunantwort: Die verschiedenen T-Helfer-Zellen

T-Helfer-Zellen sind verantwortlich für die Generierung einer passenden Immunantwort gegen Pathogene. Sie lassen sich, entsprechend ihrer Funktion und ihres Zytokinprofils, in verschiedene Subtypen von Effektorzellen einteilen, wobei Th1- und Th2-Zellen, neben regulatorischen T-Zellen (Treg), Th17-, Th22- und Th9-Zellen, zwei wichtige T-Zell-Klassen darstellen (Constant 1997, Zhou 2009, Annunziato 2009).

Th1-Zellen vermitteln den Schutz gegen intrazelluläre Pathogene und Viren (Corry 1999, Rengarajan 2000). Th2-Zellen dagegen spielen eine zentrale Rolle in der Pathogenese von Allergien, sowie bei der Bekämpfung extrazellulärer Parasiten (Locksley 1994). Das Leitzytokin von Th1-Zellen ist IFN γ . Das korrespondierende Leitzytokin der Th2-Zellen ist IL-4, die weiterhin IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13 sezernieren.

Beide T-Zell-Subtypen haben ihren Ursprung in einer gemeinsamen Vorläuferzelle, der Th0-Zelle. In welche Art von T-Helfer-Zelle sich eine Th0-Zelle entwickelt, hängt ganz entscheidend vom Zytokinmilieu ab, in dessen Anwesenheit die Zelle das erste Mal ihr Antigen präsentiert bekommt. So fördert das Vorhandensein von IL-4 die Differenzierung zu Th2-Zellen und hemmt gleichzeitig die Bildung von Th1-Zellen. Umgekehrt begünstigen IL-12 und Interferon gamma (IFN γ) die Differenzierung zu Th1-Zellen und hemmen die Bildung des Th2-Subtyps (Mosmann 1996, O'Garra 2000, Murphy 2002, Lohoff 2005). Aber nicht nur das Zytokinmilieu entscheidet über die Differenzierung in Th1- oder Th2-Zellen, sondern auch die Art und Menge des Antigens, dessen Eintrittsort, die Stärke des Signals durch den TCR, die Art des kostimulatorischen Signals und der APC-Typ spielen eine Rolle (Constant 1997, Romagnani 1997, Corry 1999). So wird

durch Allergene wie Pollen, Hausstaub oder Schimmelpilze die Differenzierung zu Th2-Zellen begünstigt. Bakterielle oder virale Infektionen hingegen fördern die Th1-Differenzierung (Holgate 1999, Corry 1999). Weiterhin beeinflussen die sezernierten Zytokine der verschiedenen T-Helfer-Zell-Subtypen auch den Klassenwechsel in B-Zellen. So leitet IL-4 den Wechsel zu IgE ein, während IFN γ diesen Wechsel inhibiert (Pene 1988, Nakanishi 1995) und dagegen einen nach IgG2a fördert (Corry 1999).

Ob sich letztendlich ein IgE-vermitteltes allergisches Asthma bronchiale entwickelt, hängt demzufolge davon ab, zu welchem T-Helfer-Zell-Subtyp sich die naiven Th0-Zellen bei erstmaliger Antigenpräsentation hauptsächlich differenzieren. Bei gesunden Personen überwiegt die Differenzierung zu Th1-Zellen. Bei atopischen (allergischen) Asthmatikern scheint jedoch das Th1/Th2-Gleichgewicht massiv in Richtung der Th2-Differenzierung verschoben zu sein (Holt 1999, Wills-Karp 2004). Dementsprechend spielt eine gesunde Balance zwischen Th1- und Th2-Zellen für die Entstehung von Allergie und Asthma eine wichtige Rolle. So ist IFN γ , als Effektor-Zytokin der Th1-Zellen, in der Lage die Th2-Differenzierung zu inhibieren und somit eine allergische Immunantwort zu Verhindern oder Aufzulösen (Nakajima 2007).

Neben den „klassischen“ Th-1 und Th2-Zell-Populationen wurden in den letzten Jahren eine Reihe weiterer T-Zell-Arten, wie oben schon erwähnt, entdeckt. Treg z.B. sind in der Lage sowohl die Th1- als auch die Th2-Immunantwort zu supprimieren und können damit immunregulatorisch wirken (Akdis 2004). Th17-Zellen zählen, wie Th1-Zellen, zu den inflammatorischen Zellen. Sie produzieren aber kein IFN γ sondern die Zytokine IL-17 bzw. IL-22 und sie werden mit der Pathogenese einer Vielzahl chronischer entzündlicher Erkrankungen in Verbindung gebracht (Annunzio 2009). Th9- und Th22-Zellen wurden erst vor kurzem beschrieben und sind nach ihrem jeweiligen Leitzytokin benannt. Ihre pathophysiologische Bedeutung ist jedoch noch unklar (Annunzio 2009).

1.3 Epidemiologie des Asthma bronchiale

Epidemiologische Studien konnten einen deutlichen Anstieg der Prävalenz und Inzidenz des allergischen Asthmas in den letzten 30-40 Jahren aufzeigen (ISAAC 1998, Pearce 2007) (Abb. 1.4). So stellt, am Beispiel von Deutschland, mit einer Prävalenz von 10% bei Kindern allergisches Asthma die häufigste chronische Erkrankung in dieser Altersgruppe dar (Maziak 2003). Weltweit sind zur Zeit ca. 155 Millionen Menschen von allergischem Asthma betroffen, wobei dieser epidemische Ausmaße annehmende Anstieg assoziiert

wird mit Aspekten des westlichen Lebensstils, einschließlich Luftverschmutzung und hygienischer Lebensbedingungen. Aber auch genetische, soziale und umweltbedingte Faktoren spielen eine Rolle und dürfen nicht außer Acht gelassen werden (Gold 2005).

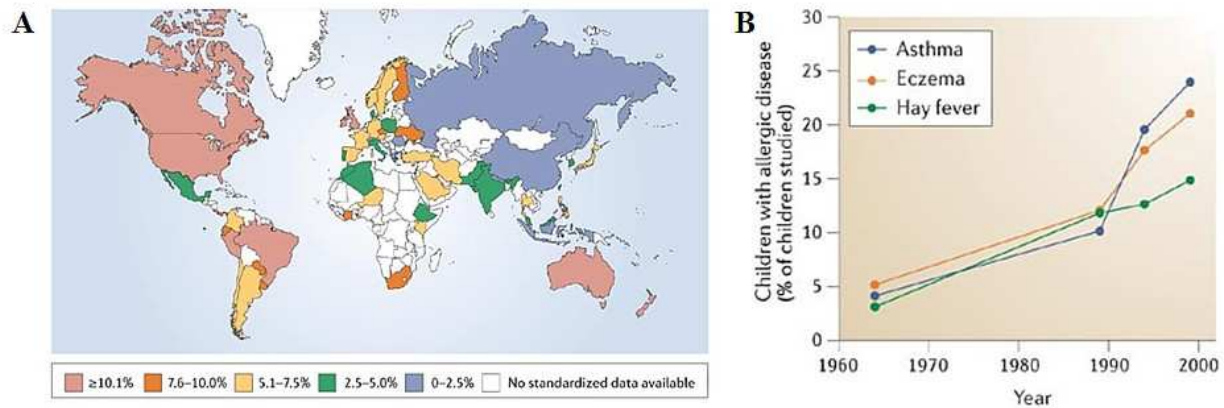


Abb. 1.4 Prävalenz des Asthma bronchiale (Devereux 2006)

A) Globale Asthma-Prävalenz: Assoziation zwischen westlichem Lebensstil und Asthma (Stand 2004).
B) Anstieg der Prävalenz von Asthma, Ekzem und Heuschnupfen bei Kindern (Aberdeen, UK) seit den 1960er Jahren.

1.3.1 Risikofaktoren

Anhand epidemiologischer Zwillings- und Familienstudien konnte gezeigt werden, dass für die Entwicklung von allergischem Asthma bronchiale eine genetische Prädisposition eine wichtige Rolle spielt (Skadhauge 1999, Kulig 1998). So liegt der bedeutendste Risikofaktor allergisches Asthma bronchiale zu entwickeln in einer atopischen Familiengeschichte. Im Vergleich zu Kindern nicht atopischer Eltern, zeigen Kinder atopischer Eltern ein 3-4fach erhöhtes Risiko an Asthma bronchiale zu erkranken (Ronmark 1997, Burke 2003).

Genetische Studien haben hier eine Reihe an Kandidatengenen identifiziert, die mit der Pathogenese der allergischen Immunantwort assoziiert sind (Hershey 1997, Robinson 1992, Ober 2006, Hunninghake 2007), so z.B. die Gene, die für die Zytokine IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13 (Daniels 1996, Marsh 1994, Heinzmann 2000) kodieren. Diese Zytokine werden von Th2-Zellen produziert und haben daher eine wichtige regulatorische Funktion innerhalb der Asthmapathogenese. Weitere Studien haben zudem gezeigt, dass genetische Variationen des MHCII (Ober 2000) und der α -Kette des TCR (Moffatt 1997), die an Antigenpräsentation und Erkennung beteiligt sind, mit dem Auftreten des allergischen Asthma bronchiale in Verbindung zu bringen sind. Aber auch Gene, die augenscheinlich keine direkte Funktion in der Asthmapathogenese haben, scheinen von

Bedeutung zu sein, so konnte z.B. bei Patienten, die bereits im Kindesalter unter Asthma bronchiale litten, ein Single-Nukleotid-Polymorphismus (SNP) im ORMDL3-Gen nachgewiesen werden, wobei ORMDL3 für ein Membranprotein des Endoplasmatischen Retikulums kodiert (Moffat 2007). Bisher konnte allerdings aufgrund der Komplexität der Interaktion der Faktoren innerhalb des Krankheitsgeschehens ein direkter Zusammenhang zwischen den einzelnen genetischen Variationen und dem sich manifestierenden Phänotyp nicht nachgewiesen werden.

Für die Erklärung der dramatischen Zunahme der Prävalenz allergischer Erkrankungen ist jedoch eine genetische Prädisposition, auch wenn sie einen bedeutenden Risikofaktor darstellt, nicht ausreichend. Eine genotypische Veränderung in der Population innerhalb weniger Jahrzehnte ist mehr als unwahrscheinlich, was zwangsläufig zu der Frage nach den Gründen für den stetigen Anstieg der Prävalenz in den letzten Jahrzehnten führt.

Neben der genetischen Prädisposition stellen Umweltfaktoren und veränderte Lebensbedingungen einen wesentlichen Risikofaktor für die Entwicklung des Asthma bronchiale dar (D'Amato 2000). So haben Studien z.B. gezeigt, dass Kinder einer genetisch weitgehend gleichen Bevölkerungsgruppe, die jedoch in einem unterschiedlichen sozioökonomischen und ökologischen Umfeld aufwuchsen (Ostdeutschland versus (vs.) Westdeutschland) eine unterschiedliche Prävalenz für allergische Erkrankungen aufwiesen (von Mutius 1994). Auch in der "International Study of Asthma and Allergic Diseases in Children" (ISAAC 1998) konnte demonstriert werden, dass in Industrieländern eine höhere Prävalenz für Asthma und Allergien besteht im Vergleich zu weniger entwickelten Ländern. Durch eine Reihe epidemiologischer Studien konnte weiterhin eine Anzahl von Faktoren identifiziert werden, die mit der Entwicklung von Allergien in Zusammenhang stehen. So weisen Kinder mit einer hohen Geschwisterzahl (Strachan 1989, von Mutius 1994, Jarvis 1997) oder solche, die Kinderrippen besucht haben (Celedon 1999, Ball 2000) eine geringere Inzidenz für Allergien und Asthma auf. Aber auch Ernährungsgewohnheiten (von Mutius 1998, Black 1997, Fogarty 2000), Allergenexposition (Wahn 1997), die soziale Klasse der Eltern (Heinrich 1998), „Luftverschmutzung“ (Abgase, Tabakrauch) (Magnusson 2005, Fedulov 2008) etc. scheinen mit allergischen Erkrankungen zu korrelieren und Hinweise auf deren Entstehung zu geben.

Auch die Rolle von bakteriellen und viralen Infektionen darf für die Entwicklung des Krankheitsbildes des allergischen Asthma bronchiale nicht außer acht gelassen werden,

wobei die exakte Bedeutung der Krankheitserreger für die Initiation dieser Erkrankung noch nicht vollständig geklärt ist.

Die interessanteste Theorie bezüglich der Bedeutung von Pathogenen ist die „Hygiene-Hypothese“ (Strachan 1989, 2000), welche besagt, dass der Anstieg der Allergie- und Asthma-Prävalenz in industrialisierten Ländern ein direktes Ergebnis verminderter bakterieller Infektionen bzw. Exposition im Kindesalter ist, bedingt durch die ständige Verbesserung der hygienischen Bedingungen. Das heißt, hier wird von einer allergieprotektiven Rolle bakterieller Exposition ausgegangen.

1.3.2 Protektive Faktoren – die Rolle mikrobieller Stimuli

Die „Hygiene-Hypothese“ wird gestützt durch eine Reihe epidemiologischer Studien, die zeigen konnten, dass eine bakterielle Exposition möglicherweise einen Schutz vor allergischen Erkrankungen darstellt (Riedler 2000, Braun-Fahrlander 2002, Pfefferle 2009, Björkstén 2001, Alfvén 2006, von Mutius 2000). Hier stellt sich die Frage, welcher Art die Interaktion der Mikroben mit dem Immunsystem beschaffen sein muss, um einen protektiven Effekt hinsichtlich der Entstehung allergischer Erkrankungen auszuüben. Hier scheint der Darmflora als quantitativ größter Quelle mikrobieller Stimulation und damit zentraler Pathogenitätsfaktor im Hinblick auf die Entstehung von Allergie eine gewisse Bedeutung zuzukommen. So konnte gezeigt werden, dass die Kolonisierung des Darms mit Laktobazillen invers mit dem Auftreten von Asthma bronchiale korreliert (Björkstén 1999, Sepp 2000, Sjögren 2009). Die ersten Lebensmonate, in denen die Keimbeseidlung des Darms erfolgt, scheinen dabei für das Risiko einer späteren allergischen Erkrankung entscheidend zu sein (Björkstén 2001).

Des Weiteren spielt auch die Aufnahme von Mikroben und/oder mikrobiellen Bestandteilen über die Atemwege eine wesentliche Rolle, was sehr eindrucksvoll durch eine Querschnittsstudie zu Allergieprävalenz an Schulkindern belegt wurde (ALEX-Studie). Hier zeigte sich beim Vergleich von Kindern, die in einem ruralen, bzw. in einem nicht-bäuerlichen Umfeld aufwuchsen, dass die Kinder des bäuerlichen Umfelds (Kontakt zu Stall, Tieren und unpasteurisierte Milch) ein bis zu 50% niedrigeres Risiko aufwiesen an einer Allergie zu erkranken, als die Kinder aus dem nicht-bäuerlichen Milieu. Es fanden sich weiterhin Hinweise darauf, dass die protektiven Effekte der stärkeren Exposition der „Bauernkinder“ mit bakteriellen Komponenten auf die Lipopolysaccharid (LPS)-Aerosolinhalation und das Trinken unpasteurisierte Kuhmilch zurückzuführen sein könnten (Riedler 2000, Riedler 2001, Braun-Fahrlander 2002). Hier ist besonders

hervorzuheben, dass der protektive Effekt hauptsächlich während des ersten Lebensjahres vermittelt wurde. So wiesen Kinder bei denen die „Farm“-Exposition vor und während des ersten Lebensjahres stattfand im Vergleich zu Kindern, die nach dem ersten Lebensjahr einer solchen Exposition ausgesetzt waren, eine geringere Frequenz von Asthma (1% vs. 11%), Heuschnupfen (3% vs. 13%) und atopischer Sensibilisierung (12% vs. 29%) auf. Dies deutet darauf hin, dass die Etablierung und Ausprägung einer Allergie bereits sehr früh in der kindlichen Entwicklung, inklusive der Schwangerschaft, gebahnt bzw. verhindert wird (von Mutius 2007).

Die bei diesen Studien gefundenen Ergebnisse konnten wiederum tierexperimentell untermauert werden. So zeigte sich, dass zwei aus traditionell geführten Kuhställen isolierte Keime in einem Mausmodell des experimentellen Asthmas nach intranasaler Applikation einen protektiven Effekt bezüglich des asthmatischen Phänotyps ausübten (Debarry 2007). Bei den hier verwandten Keimen handelte es sich um die apathogenen Bakterien *Acinetobacter lwoffii* F78 (*A. lwoffii* F78) (gram-negativ) und *Lactococcus lactis* G121 (gram-positiv), die in großer Menge in traditionellen Kuhställen vorhanden sind und mit denen auch im Rahmen dieser Arbeit gearbeitet wurde. Auch die Behandlung von Mäusen mit bakteriellen Bestandteilen, wie LPS und bakterieller CpG-DNA zeigte einen antiallergischen immunmodulierenden Effekt (Klinman 2004, Blümer 2005).

Die oben genannten Studien und Versuche verdeutlichen, dass gewisse Strukturen von Bakterien in der Lage sein müssen, das Immunsystem derart zu modulieren, dass allergische Reaktionen weniger stark ausfallen oder erst gar nicht entstehen. Weiterhin lassen die Studienergebnisse vermuten, dass es ein gewisses Zeitfenster gibt, nämlich die pränatale und frühkindliche Lebensphase, in welcher diese Immunmodulation durch bakterielle Stimuli stattfinden muss, um zur Reifung einer normalen Th1-Immunantwort zu führen.

Trotzdem die Bedeutung der bakteriellen Exposition, sowohl pränatal als auch im ersten Lebensjahr, mittlerweile bekannt ist (Jones 2000, Burney 2002, Lau 2002), fehlt es jedoch noch an Wissen über die molekularen Mechanismen, die hinter dieser Immunmodulation in Richtung eines ausgeglichenen Th1/Th2-Verhältnisses stehen.

Bisher wurde davon ausgegangen, dass die Entwicklung eines asthmatischen Phänotyps das Ergebnis einer genetischen Prädisposition im Zusammenspiel mit verschiedenen Umweltfaktoren (Allergene, Infektionen, Luftverschmutzung etc.) ist. Es ist jedoch sehr unwahrscheinlich, dass solche Gen-Umwelt-Interaktionen innerhalb der letzten Dekaden zu genetischen Veränderungen geführt haben, die die drastisch ansteigende Asthma-

Prävalenz erklären. Dennoch ist bisher unklar, über welche Mechanismen Komponenten aus der Umwelt allergieprotektive Effekte vermitteln. Neue Ergebnisse zeigen hier, dass es durch Gen-Umwelt-Wechselwirkungen auch zur Modulation epigenetischer Regulationsmechanismen kommen kann, die ihrerseits zum individuellen Allergie- und Asthmarisiko beitragen können (Liu 2007, Hollingsworth 2008, White 2006, Kwon 2008, Martino 2010).

1.4 Epigenetik

Der Begriff Epigenetik beschreibt Veränderungen des Phänotyps oder des Genexpressionsstatus, die nicht durch eine Veränderung der DNA-Sequenz gekennzeichnet sind, sondern durch Veränderungen an Modifikationen der DNA oder DNA-assoziierten Proteinen. Die Hauptmechanismen epigenetischer Regulation sind DNA-Methylierung und kovalente posttranslationale Modifikation von Histon-Proteinen. Diese Art der Regulation stellt einen essentiellen Mechanismus während der Entwicklung und Zelldifferenzierung dar und scheint eine wichtige Rolle bei der Verbindung von endogenen- und Umweltsignalen während des Lebens einer Zelle oder eines Organismus zu haben (Jaenisch 2003, Herceg 2007, Feinberg 2006). In Analogie dazu ist die Deregulation epigenetischer Mechanismen assoziiert mit einer Reihe von Erkrankungen. So spielt z.B. epigenetische Deregulation eine bedeutende Rolle bei der Tumorgenese (Egger 2004, Jones 2002).

Da die DNA-Sequenz hier unverändert bleibt, können epigenetische Modifikationen und die Informationen, die sie vermitteln, vererbbar sein ohne ihre Plastizität zu verlieren, d.h. das Potential vorhandene Modifikationen zu löschen und neue zu erstellen bleibt erhalten. Die verschiedenen Arten epigenetischer Modifikationen sind eng miteinander verbunden und modulieren sich oft gegenseitig bei der Regulation verschiedener zellulärer Prozesse. So triggert z.B. die DNA-Hypermethylierung innerhalb einer Promotorregion die Deacetylierung lokaler Histone, wohingegen geringere Level der Histonacetylierung die zielgerichtete DNA-Methylierung unterstützen (Vaissière 2008). Dennoch sind die Mechanismen, die der Modulation von epigenetischen Modifikationen zugrunde liegen noch weitgehend unverstanden.

1.4.1 DNA-Methylierung

Methylierte DNA liegt dann vor, wenn innerhalb eines CpG-Dinukleotides eine Methylgruppe kovalent an der C⁵-Position des Cytosins gebunden ist (Abb. 1.5).

Der Prozess der Methylierung wird von zwei verschiedenen Arten von Methyltransferasen katalysiert: *de novo*- und maintenance Methyltransferasen (Bird 2002). Die *de novo*-Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B etablieren neue Methylierungsmuster während der frühen Entwicklungsphase. Schon vorhandene Methylierungsmuster hingegen werden von der maintenance Methyltransferase DNMT1 mit extremer Genauigkeit kopiert, was zur Reproduktion der Methylierungsmuster methylierter und nicht methylierter Stellen während der Replikation führt (Bird 2002). Das korrekte Funktionieren dieser Methylierungsmaschinerie ist für die normale Entwicklung verschiedener Organismen, einschließlich Säugern und Pflanzen, essentiell. So ist das Fehlen auch nur einer der Methyltransferasen während der embryonalen Entwicklungsphase assoziiert mit einer kompletten DNA-Demethylierung, was wiederum in einem letalen Phänotyp resultiert (Jaenisch 2003, Lei 1996, Li 1992).

Ein interessantes Muster der DNA-Methylierung stellt das Vorhandensein CG-reicher Regionen, sogenannter „CpG-Islands“, dar. Diese Sequenzbereiche sind typischerweise unmethyliert und finden sich häufig in Promotorbereichen von Genen wieder (Bird 2002). Interessanterweise sind diese in normalen Zellen unmethylierten Bereiche in Tumorzellen häufig hypermethyliert, was assoziiert ist mit dem abnormalen „Silencing“ von Tumor-Suppressor-Genen und anderen Krebs-assoziierten Genen. Daher wird eine Veränderung von Methylierungsmustern in „CpG-Islands“ mit malignen Transformationen in Verbindung gebracht.

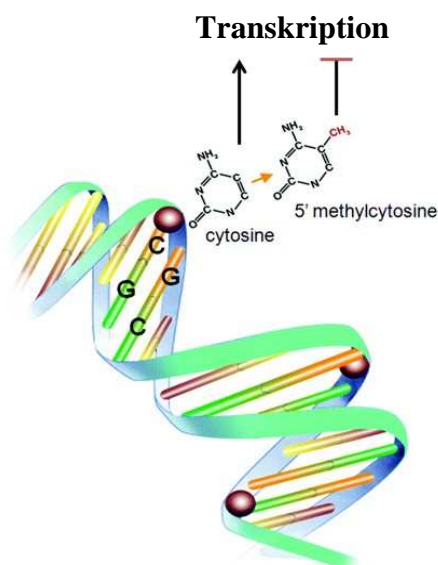


Abb. 1.5 Regulation der Transkription durch DNA-Methylierung (modifiziert nach Barros 2009)

Methylierung von CpG-Motiven führt zur Repression der Transkription durch Inhibition der Bindung regulatorischer Proteine. Liegen die entsprechenden CpG-Motive jedoch unmethyliert vor, kann Transkription stattfinden, ist jedoch nicht dadurch bedingt.

Die DNA-Methylierung selbst wird weithin als Regulator von Genexpression angesehen, wobei die vorherrschende Konsequenz von Methylierung die Repression der Transkription ist, welche sowohl direkt als auch indirekt vermittelt werden kann. Die direkte Inhibition der Transkription geschieht durch Blockade der Bindung von regulatorischen Proteinen, wie Transkriptionsfaktoren, an Promotorbereiche die methylierte CpG-Motive enthalten (Igushi-Arigo 1989) (Abb. 1.5). Bei der indirekten Inhibition der Transkription spielen Proteine, die über eine Methyl-CpG-Binde-Domäne (MBD) spezifisch an methylierte DNA binden, eine entscheidende Rolle. Man nimmt an, dass hier die Transkriptionsrepression durch die Rekrutierung von Histondeacetylasen (HDAC) zur methylierten DNA vermittelt wird, was in einer deacetylierten repressiven Chromatinstruktur resultiert (s. Punkt 1.4.2) (Jones 1998, Bird 2002). Aber auch weitere Repressionsmechanismen werden angenommen, wie z.B. Inhibition der RNA-Polymerase-Elongation (Rountree 1997), Beeinträchtigung des Beladens der RNA-Polymerase (Kass 1997) und Interferenz mit der RNA-Polymerase-Initiation (Schubeler 2000).

1.4.2 Der Histon Code – Histonmodifikationen

Die strukturelle Basiseinheit des Chromatins wird durch das Nukleosom dargestellt, welches aus 146bp DNA besteht, die um ein Oktamer von Histonen (je 2x H2A, H2B, H3 und H4) gewunden sind (Margueron 2005) (Abb. 1.6A). Nukleosomen haben eine zentrale globuläre Domäne und relativ unstrukturierte N- und C-terminale Schwänze, wobei die N-terminalen Schwänze posttranslationalen Modifikationen wie Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitinierung, Sumoylierung etc. unterworfen sind. Solche Modifikationen wiederum können zu einer grundlegenden Veränderung der lokalen Chromatinstruktur führen und auch die Inkooperation des Linkerhistons H1 in das Nukleosom kann den Kondensationsgrad des Chromatins beeinflussen (Trojer 2007) (Abb. 1.6B).

Die Histon-Code-Hypothese besagt nun, dass spezifische Kombinationen von Histonmodifikationen eine Art Sprache bilden, die den strukturellen Status des Chromatins definiert (Strahl 2000), d.h. ob die DNA in Form von Heterochromatin in Nukleosomen eng verpackt ist, oder ob das eher lose gepackte Euchromatin vorliegt. Verglichen mit dem Euchromatin ist das Heterochromatin weitgehend unzugänglich für die Transkriptionsmaschinerie, was es relativ inert gegenüber Transkription macht. Daher ist die Voraussetzung für eine selektive, gewebespezifische Transkription bestimmter

Gene die strukturelle Veränderung der Genloci, um die DNA der Transkription zugänglich zu machen. Dies geschieht unter anderem durch die verschiedenen posttranslationalen Modifikationen der N-terminalen Histonschwänze. Zusätzlich zu den verschiedenen Möglichkeiten der Modifikationen, wird das Ganze noch dadurch verkompliziert, dass viele der Modifikationen zu mehreren Zeitpunkten am gleichen Aminosäurerest eines Histonschwanzes vorkommen können, was die Verknüpfung bestimmter Modifikationen mit aktivem (Euchromatin) oder repressivem Chromatin (Heterochromatin) erschwert. Dennoch werden bestimmte Arten der Modifikationen häufiger im Heterochromatin als im Euchromatin vorgefunden (Tab. 1.1).

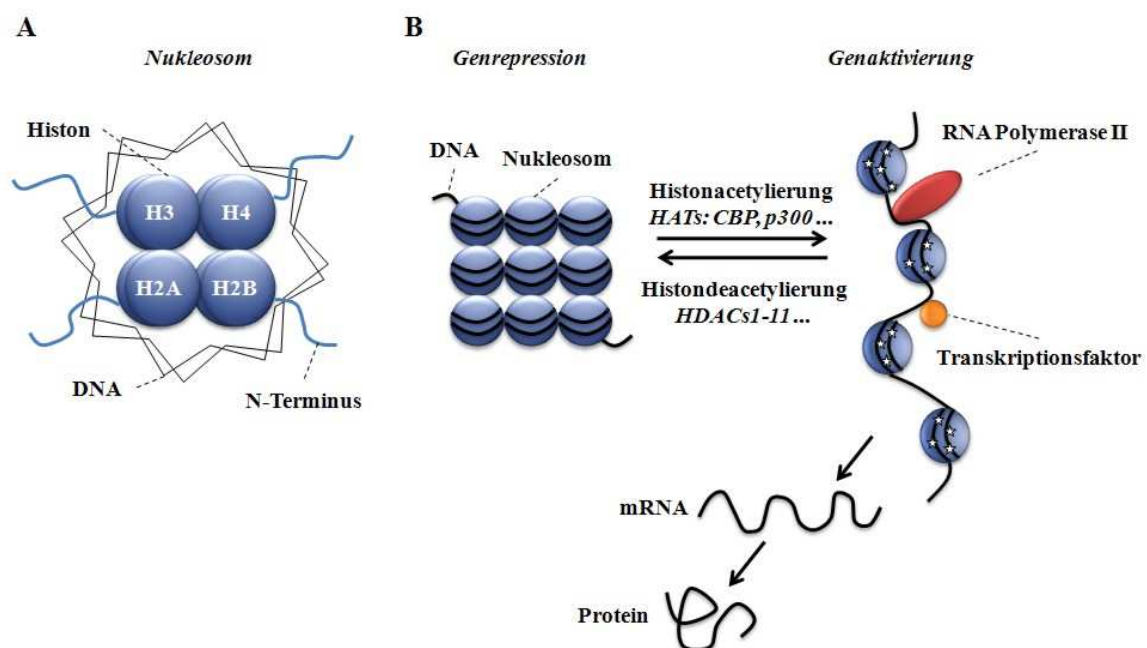


Abb. 1.6 Chromatinstruktur (modifiziert nach Barnes 2005)

- A) Die Struktur des Chromatins baut sich aus DNA auf, die um Histonmoleküle (je 2mal H2A, H2B, H3 und H4) gewunden ist und ein Nukleosom bildet. Jedes Histonmolekül besitzt einen langen N-Terminus, dessen Aminosäure-Reste enzymatisch modifiziert werden können.
- B) Regulation der Genaktivierung und Genrepression am Beispiel der Histonacetylierung: Histonacetylierung (☆) wird vermittelt durch Histonacetyltransferase (HAT)-Aktivität, was zur Öffnung der Chromatinstruktur führt. Dies erlaubt die Bindung von RNA Polymerase II und Transkriptionsfaktoren und somit die Transkription. Dieser Vorgang wird umgekehrt durch Histondeacetylasen (HDACs), was zur Genrepression führt.

So findet sich die Modifikationsart der Acetylierung der Histone H3 und H4 gewöhnlicherweise in aktivem Chromatin. Methylierung, auf der anderen Seite, spielt eine duale Rolle und hat sowohl Bedeutung bei der Repression, als auch bei der Aktivierung von Transkription. Hier kommt es darauf an, an welcher Aminosäure des N-terminalen

Schwanzes die Modifikation vorhanden ist und ob eine Mono-, Di- oder Trimethylierung vorliegt. Die Trimethylierung des vierten Lysins im Histon H3 (H3K4me3) ist z.B. mit transkriptioneller Aktivität assoziiert. Trimethylierung des neunten Lysins (H3K9me3) oder des 27. Lysins (H3K27me3) wird dagegen hauptsächlich mit Repression in Verbindung gebracht (Berger 2007).

Tab. 1.1 Chromatinmodifikationen

Modifikation	Histon (Aminosäure-Position)	Rolle bei Transkription
Acetyliertes Lysin (Kac)	H3 (9, 14, 18, 56), H4 (5, 18, 13, 16)	Aktivierung
Methyliertes Lysin (Kme)	H3 (4, 36, 79)	Aktivierung
	H3 (9, 27), H4 (20)	Repression
Methyliertes Arginin (Rme)	H3 (17, 23), H4 (3)	Aktivierung
Phosphoryliertes Serin / Threonin (S/Tph)	H3 (3, 10, 28)	Aktivierung
Ubiquityliertes Lysin (Kub)	H2B (120)	Aktivierung
	H2A (119)	Repression
Sumoyliertes (Ksu)	H2B (6/7), H2A (126)	Repression

Wie diese Modifikationen den Chromatinstatus beeinflussen ist noch nicht komplett verstanden. Zum jetzigen Zeitpunkt wird von zwei verschiedenen Mechanismen ausgegangen. So bewirkt eine Acetylierung eine negative Ladung der Histone, was zu einer Steigerung der Abstoßungskräfte zwischen Nukleosomen und negativ geladener DNA führt. Dies wiederum führt zu einer Öffnung der Chromatinstruktur. Andere Modifikationen, wie z.B. Methylierung, haben keinen Einfluss auf die Ladung, erlauben aber die Bindung von Proteinkomplexen mit Chromatin-modulierenden Eigenschaften.

1.4.3 Epigenetische Regulation der Th1/Th2-Differenzierung

Aus naiven CD4⁺-T-Zellen entwickeln sich nach ihrem initialen Kontakt mit APCs verschiedene T-Helfer-Subtypen, deren Funktion auf ihre Rolle in der Immunantwort zugeschnitten ist. Die Instruktionen, die die naiven T-Zellen während des APC-Kontaktes erhalten, müssen in intrinsische zelluläre Veränderungen konvertiert werden, die zur Differenzierung in die verschiedenen T-Zell-Subtypen führen. Es kommt zu Veränderungen des Vorhandenseins, der Interaktion und der Lokalisation verschiedener T-Zell-spezifischer Transkriptionsfaktoren, resultierend in einer veränderten Genexpression z.B. von Zytokinen oder weiteren Transkriptionsfaktoren. Die präzise Kontrolle der Genexpression wird hier durch epigenetische Prozesse erreicht, welche die vererbare und stabile Programmierung der Genexpression erleichtern, das Potential zur Modifizierung dieser Programme als Antwort auf Umwelteinflüsse bleibt jedoch erhalten.

1.4.3.1 Der IFN γ -Lokus

Dass epigenetische Modulation bei der Regulation der IFN γ -Expression eine Rolle spielt, wurde vor mehr als zehn Jahren zum ersten Mal beschrieben. Man hat hier festgestellt, dass murine Th1- und Th2-Zell-Klone im Bereich des IFN γ -Promotors ein unterschiedliches Methylierungsmuster aufweisen und dass die Behandlung von Th2-Zell-Klonen mit einem Demethylierungsreagenz (5-Azacytidin) in der Expression von IFN γ resultiert (Young 1994). Obwohl der IFN γ -Promotor zu einem erheblichen Grad die Transkription von IFN γ reguliert, hat sich gezeigt, dass auch weitere distale Elemente bei der Initiation der IFN γ -Expression von Bedeutung sind. Zum Beispiel die Conserved Noncoding Sequence (CNS)-6 Region, die sich ca. 6kb „upstream“ des Transkriptionsstarts (TSS) befindet und Bindestellen für Th1-spezifische Transkriptionsfaktoren aufweist. Die DNA von Th1-Zellen ist an dieser Stelle sensitiv für den Verdau durch das Enzym DNaseI (d.h. hier liegt das Chromatin in einer offenen und damit für Enzyme angreifbaren Konformation vor) und zeigt sich tolerant gegenüber Histonmodifikationen, was impliziert dass Th1-Zellen hier zugänglicher sind für regulatorische Proteine wie z.B. Transkriptionsfaktoren im Vergleich zu Th2-Zellen (Lee 2004). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass der IFN γ -Lokus eine Reihe von weiteren CNS-Regionen (-54, -34, -22, -6, +18, +29, +46) enthält, wobei die distalen Elemente (-54 / +46) hier eine Art Grenzfunktion zu haben scheinen, evtl. um das IFN γ -Gen vor dem Einfluss der benachbarten Gene und/oder ihren regulatorischen Elementen zu schützen (Schoenborn 2007) (Abb. 1.7).

Epigenetische Kontrolle des IFN γ -Lokus

Aktiviert naive T-Zellen produzieren geringe Mengen an IFN γ , was impliziert, dass sich der IFN γ -Lokus in einer Art Bereitschaftszustand befindet. Die DNA im Bereich des IFN γ -Promotors und in den CNS-34-, CNS-22-, CNS+29- und CNS+46-Regionen ist in naiven T-Zellen hypomethyliert. Zugleich zeigen CNS-22 und CNS-34 geringe Level aktivierender Histonmodifikationen (Jones 2006, Schoenborn 2007, Hatton 2006). Umgekehrt sind aber auch geringe Level repressiver Histonmodifikationen über den Bereich des IFN γ -Gens zu finden, so dass insgesamt bivalente Histonmodifikationen im IFN γ -Lokus vorhanden sind, was ihn als „bereit“ markiert, sowohl für die Expression als auch das „Silencing“ von IFN γ .

Während des Verlaufs der T-Zell-Differenzierung sind der Promotor und die CNS-Elemente des IFN γ -Gens Gegenstand epigenetischer Modifikationen, die die Transkription verstärken und die Zugänglichkeit des IFN γ -Lokus in Th1-Zellen erhöhen (Abb. 1.7).

So kommt es während der Th1-Differenzierung zu einer bedeutenden Erhöhung aktivierender Histonmodifikationen (H3K4me2, H3 und/oder H4ac), dem Erwerb DNaseI hypersensitiver Stellen an regulatorischen Elementen des IFN γ -Lokus und einem kompletten Verlust repressiver Histonmodifikationen über den gesamten IFN γ -Lokus hinweg (Agarwal 1998, Schoenborn 2007, Hatton 2006, Lee 2004, Shnyreva 2004).

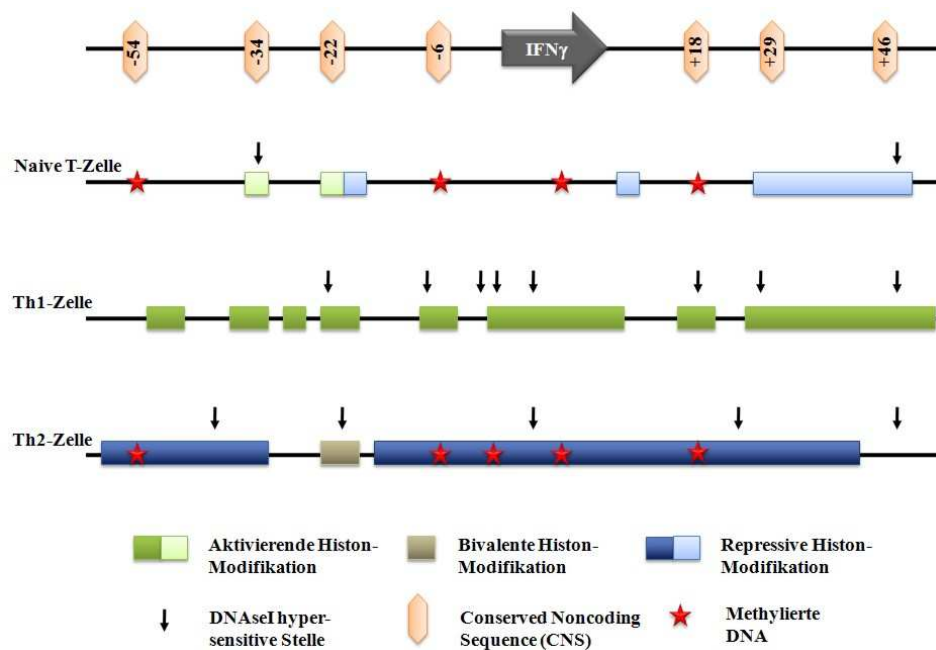


Abb. 1.7 Aufbau und Modifikationen des murinen IFN γ -Lokus (modifiziert nach Wilson 2009)

Naive T-Zellen zeigen geringe (hell) Level an aktivierenden und repressiven Histonmodifikationen und DNA-Methylierung an einigen regulatorischen Regionen des Lokus. In Th1-Zellen ist der Locus demethyliert und es sind hohe (dunkel) Level an aktivierenden Histonmodifikationen vorhanden, die sich auch über den IFN γ -Promotor erstrecken. Bei der Differenzierung zu Th2-Zellen dagegen ist nahezu der gesamte Locus von repressiven Histonmodifikationen betroffen und es kommt zur zusätzlichen DNA-Methylierung innerhalb IFN γ -Promotorbereichs.

Im Gegensatz zu den aktivierenden Chromatinmodifikationen, die sich während der Th1-Differenzierung am IFN γ -Lokus ereignen, kommt es zu repressiven Modifikationen während der Th2-Differenzierung. Die zunächst hypomethylierten CpG-Motive der IFN γ -Promotorregion werden methyliert, wobei der konservierten -59bp Position (relativ zum TSS) anscheinend eine besondere Bedeutung zukommt. Hier konnte gezeigt werden, dass es durch Methylierung an dieser Position zu einer Dislokalisierung der

Transkriptionsfaktoren ATF2/c-Jun und CREB kommt, was ein „Silencing“ der IFN γ -Transkription zur Folge hat (Jones 2006). Im Gegensatz zu der Promotorregion bleiben distale Elemente des IFN γ -Lokus jedoch unmethyliert, einschließlich der Regionen CNS-34, CNS-22, CNS+29 und CNS+46, was nahelegt dass Methylierung an diesen Stellen keine Rolle beim IFN γ -„Silencing“ während der Th2-Differenzierung spielt.

Weiterhin spielen auch Histonmodifikationen bei dem Verlust der Fähigkeit IFN γ zu produzieren eine bedeutende Rolle. So kommt es neben einer Veränderung des DNA-Methylierungsgrades zusätzlich zum Verlust aktivierender und dem Zufügen repressiver Histonmodifikationen (Abb. 1.7) (Chang 2007).

1.4.3.2 Der Th2-Lokus

Der Th2-Lokus enthält die Gene für die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, die einen bedeutenden Anteil an der allergischen Immunantwort haben, sowie für das konstitutiv exprimierte Rad50-Gen. Die Assoziation dieser Gene am Th2-Lokus, als auch ihre lineare Anordnung, ist hochkonserviert innerhalb des Säuger-genoms, was darauf schließen lässt, dass diese Anordnung funktionell von Bedeutung ist. Entsprechend dieser Annahme werden die Gene, die für die Th2-Zytokine kodieren nicht nur über ihre Promotorbereiche reguliert, sondern auch durch mehrere zusätzliche regulatorische Elemente, deren Lokalisation, wie beim IFN γ -Lokus, durch die Analyse konservierter nicht kodierender Sequenzen (CNS) und DNaseI-Hypersensitivitätsstellen identifiziert wurde. So konnte in der intergenischen Region zwischen den Genen für IL-4 und IL-13 die CNS-1-Sequenz als regulatorisches Element gefunden werden (Takemoto 1998), welche Enhancer-Eigenschaften besitzt und Transkriptionsfaktor-Bindestellen enthält (Lee 2001). Durch Deletion dieses Sequenzabschnitts kommt es zu einer verringerten Anzahl an IL-4, IL-5 und IL-13 produzierenden Zellen (Mohrs 2001), was die Bedeutung dieser Sequenz für die Zytokinproduktion bestätigt.

Eine weitere wichtige regulatorische Region des Th2-Lokus ist die „Locus Control Region“ (LCR), welche sich am 3'Ende des Rad50-Gens befindet und mehrere DNaseI-Hypersensitivitätsstellen enthält, wobei das RHS7-Element am Besten untersucht ist (Lee 2006). Ferner konnte eine Reihe von weiteren evolutionär konservierten Regionen gefunden werden z.B. CNS-2 (Agarwal 1998), die ebenfalls Enhancer-Eigenschaften und Transkriptionsfaktor-Bindestellen aufweisen (Abb. 1.8).

Epigenetische Kontrolle des Th2-Lokus

Die oben genannten regulatorischen Regionen sind neben den Promotorregionen Gegenstand verschiedener epigenetischer Modifikationen im Verlauf der Th2-Differenzierung.

In frisch aktivierten naiven T-Zellen ist noch, wie auch beim IFN γ -Lokus, ein geringes Niveau sowohl an aktivierenden als auch an repressiven Modifikationen innerhalb des Th2-Lokus vorhanden, was zu einem bivalenten epigenetischen Status führt. Im Verlauf der Th2-Polarisierung kommt es dann jedoch zu einer DNA-Demethylierung am 5' Ende des IL-4 Gens, der RHS7- und der CNS-1-Region (Lee 2002). Dieser Prozess geht der Th2-Zytokinexpression voraus und scheint besonders für die Stabilisierung des Th2-Status von Bedeutung zu sein. Weiterhin kommt es auch zu aktivierenden Histonmodifikationen wie z.B. H3- und H4-Acetylierung und H3K4-Dimethylierung, wobei diese nicht unbedingt aktive Transkription widerspiegeln, sondern wohl eher das Potential, Transkription stattfinden lassen zu können (Baguet 2004). Die repressiven Histonmodifikationen dagegen gehen über den gesamten Th2-Lokus hinweg verloren (Abb. 1.8).

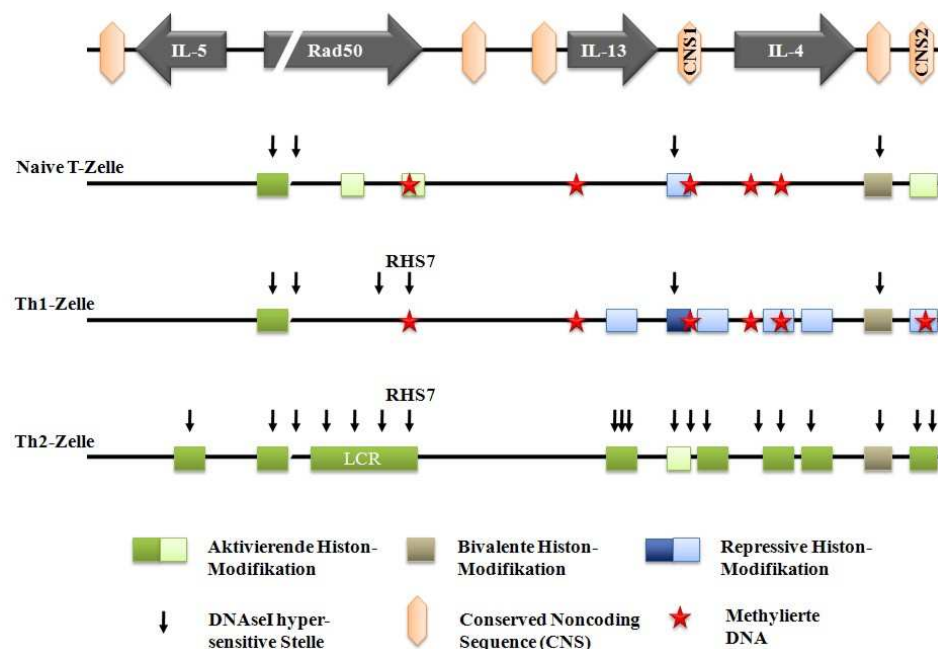


Abb. 1.8 Aufbau und Modifikationen des murinen Th2-Lokus (modifiziert nach Wilson 2009)

Naive T-Zellen weisen DNA-Methylierung an regulatorischen Regionen des Locus auf und zeigen geringe (hell) Level sowohl an aktivierenden, als auch an repressiven Histonmodifikationen. Bei Th2-Zellen ist die DNA dagegen demethyliert, eine Reihe von DNaseI-Hypersensitiven Stellen ist vorhanden und der Locus weist hohe (dunkel) Level an aktivierenden Histonmodifikationen auf. Im Gegensatz dazu bleibt die DNA-Methylierung bei der Differenzierung zu Th1-Zellen erhalten und es kommt zu repressiven Histonmodifikationen über den Locus hinweg.

Im Gegensatz zu den aktivierenden Chromatinmodifikationen die sich während der Th2-Differenzierung ereignen, kommt es zu repressiven Modifikationen während der Th1-Differenzierung, indem der Th2-Lokus durch H3K27-Trimethylierung reprimiert wird (Koyanagi 2005) (Abb. 1.8).

1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Epidemiologische Studien konnten zeigen, dass die bakterielle Exposition auf traditionellen Bauernhöfen, insbesondere wenn diese pränatal und im Kleinkindalter erfolgt, mit der Protektion vor allergischen Erkrankungen einschließlich des Asthma bronchiale assoziiert ist (von Mutius 2000, Riedler 2001, Braun-Fahrlander 2002, Alfvén 2006, Pfefferle 2009).

Um die Mechanismen, die dieser Protektion zugrunde liegen, näher zu analysieren, wurden im Rahmen der ALEX-Studie verschiedene Keime aus Stallstäuben von mit Allergieprotektion assoziierten Bauernhöfen isoliert. Für zwei dieser Keime, *Acinetobacter lwoffii* F78 (gram-negativ) und *Lactococcus lactis* G121 (gram-positiv), wurde bereits innerhalb des SFB/TR22 untersucht, inwiefern sie nach intranasaler Applikation einen Einfluss auf die akute Atemwegsentzündung im Tiermodell des experimentellen Asthmas haben. Hier zeigte sich, dass beide Keime asthmaprotektive Eigenschaften aufweisen (Debarry 2007). Weiterhin konnte in der Arbeitsgruppe für den Keim *A. lwoffii* F78 bereits gezeigt werden, dass auch die pränatale Exposition mit diesem Bakterium, in Nachahmung einer natürlichen Bauernhofsituation, zu einer deutlichen Reduktion des asthmatischen Phänotyps führt, was die Bedeutung der pränatalen Phase als effektiven Zeitpunkt der bakteriellen Exposition untermauert (Conrad 2009).

Die Ergebnisse dieser Versuche werfen die Frage nach den molekularen Mechanismen hinter der Allergieprotektion nach pränataler mikrobieller Exposition auf. Nachdem gezeigt werden konnte, dass ein funktionierendes maternales angeborenes Immunsystem nötig ist, um in den Nachkommen eine Asthmaprotektion zu induzieren (Conrad 2009), scheint die in den Müttern während der bakteriellen Exposition mit *A. lwoffii* F78 stattfindende Immunreaktion zur Generation von Signalen zu führen, die durch die Plazenta übertragen werden und in den Nachkommen eine veränderte Immunregulation bewirken. In diesem Zusammenhang liefern experimentelle Studien initiale Daten dafür, dass DNA-Methylierung und Histonmodifikationen bei der Expression von Genen, die bei der T-Zell-Differenzierung von Bedeutung sind, eine wichtige Rolle spielen (Fields 2002, Chang 2007, Jones 2006, Lee 2002, Smale 2002, Wilson 2009). Da T-Zellen eine

entscheidende Funktion bei der Etablierung und Orchestrierung der allergischen Immunantwort haben, könnten solche Modifikationen in diesen Zellen der Nachkommen auch bei der Polarisierung zu einem asthmatischen Phänotyp hin oder von einem solchen weg, bedeutsam sein. In dieser Hinsicht liefern erste tierexperimentelle Arbeiten bereits Hinweise auf die Bedeutung epigenetischer Regulation bei der Entstehung allergischer Erkrankungen (Hollingsworth 2008, Liu 2008). Auf diesen initialen Daten aufbauend, wurde daher folgende Hypothese aufgestellt, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollte:

⇒ Umwelteinflüsse auf Mütter, in Form von mikrobieller Exposition während der Schwangerschaft, führen zu einer veränderten Regulation epigenetischer Modifikationen Th1/Th2-relevanter Gene in CD4⁺-T-Zellen der Nachkommen und tragen darüber zur mikrobiell-vermittelten Asthmaprävention bei.

Aus dieser Hypothese leiteten sich die Fragestellungen für diese Arbeit ab. So sollte...

(1) ... die Auswirkung einer direkten Veränderung der DNA-Methylierung auf die Ausprägung des asthmatischen Phänotyps im Tiermodell des experimentellen Asthmas untersucht werden.

Hierzu soll in einem „Proof-of-Concept“-Versuch mit Hilfe eines DNA-Methyltransferase-Inhibitors analysiert werden, ob epigenetische Modulation, in Form von Veränderung der DNA-Methylierung, sowohl systemisch, als auch T-Zell-spezifisch, einen Einfluss auf Sensibilisierung und Ausprägung des allergischen Phänotyps des experimentellen Asthmas im Mausmodell hat. Für den epigenetischen Mechanismus der Histonmodifikation konnte dies bereits gezeigt werden (Choi 2005).

(2) ... analysiert werden, inwiefern eine Veränderung des asthmatischen Phänotyps, die induziert ist durch pränatale Umwelteinflüsse in Form mikrobieller Stimuli (*A. lwoffii* F78), durch Modulation epigenetischer Mechanismen verursacht ist.

Hierfür sollte analysiert werden, ob sich die aus der ersten Fragestellung erhaltenen Ergebnisse auf ein Transgenerationen-Modell der experimentellen Asthma-Protektion übertragen lassen, indem untersucht wurde, inwiefern die pränatale Exposition mit *A. lwoffii* F78 als Modellkeim die epigenetische Regulation (DNA-Methylierung und Histonmodifikationen) am IFN γ - und Th2-Lokus in CD4⁺-T-Zellen der Nachkommen moduliert und damit zum veränderten asthmatischen Phänotyp nach *A. lwoffii* F78-Exposition beiträgt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Für die *in vivo* Studien wurden neben Wildtyp (WT)- Balb/c-Mäusen und Severe-Combined-Immunodeficiency (SCID)-Mäusen (Harlan Winkelmann, Borcheln, D), OVA-T-Zell-Rezeptor-transgene (DO11.10)-Balb/c-Mäuse (aus eigener Zucht) im Alter von 6-8 Wochen verwendet. Sämtliche Tiere wurden unter keimarmen Bedingungen in einzeln belüfteten Käfigen bei konstanter Luftfeuchtigkeit und Raumtemperatur (20°C) und einem künstlichen 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten.

2.2 Induktion einer allergischen Atemwegsentzündung

Als Basis der *in vivo* Studien diente ein Tiermodell der allergischen Atemwegsentzündung in der Balb/c-Maus. Die allergische Atemwegsentzündung wurde hier durch zwei intraperitoneale (i.p.) Injektionen von 10 µg des artfremden Proteins Ovalbumin (OVA) gelöst in 100 µL PBS ausgelöst. Die Injektionen erfolgten im Abstand von 14 Tagen in Verbindung mit dem Adjuvans Aluminiumhydroxid (Al(OH)₃) (Alum). Die systemische Applikation des Ovalbumins führt zur Bildung OVA-spezifischer Th2-Zellen. Dieser Sensibilisierungserfolg lässt sich durch den Nachweis OVA-spezifischer IgE- und IgG₁-Antikörper, die infolge eines Th2-Zytokinmilieus entstehen, feststellen.

Fünf Tage nach dem letzten Sensibilisierungsschritt wurden die Tiere an drei aufeinander folgenden Tagen jeweils für 20 min einem OVA-Aerosol (1%) ausgesetzt, wodurch ein Antigenkontakt in der Lunge ausgelöst wird, der eine lokale Entzündungsreaktion initiiert. Die Lungenfunktionsanalyse fand an Tag 22, die endgültige Analyse an Tag 23 des Protokolls statt (Abb. 2.1).

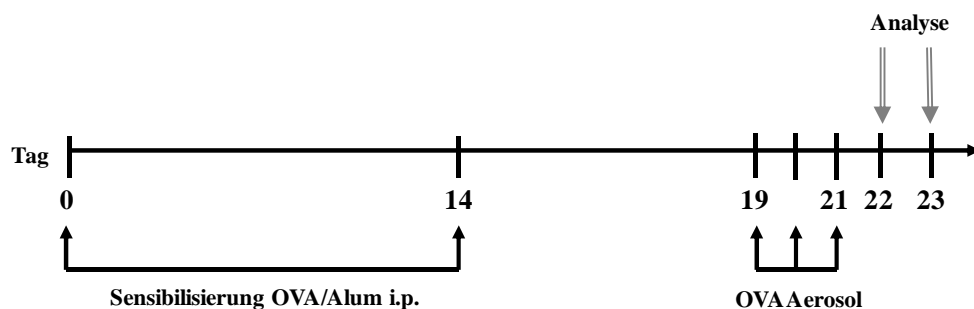


Abb. 2.1 Protokoll zur Induktion der allergischen Atemwegsentzündung

Chemikalien:

OVA Grade VI (Sensibilisierung) und V (Aerosol)	Sigma, Taufkirchen, D
Inject Alum	Pierce, Rockford, USA
PBS (Dublecco's Phosphate Buffered Saline)	PAA Laboratories, Pasching, A

2.3 Modulation der allergischen Atemwegsentzündung durch das Demethylierungsreagenz 5-Aza-2'-Deoxycytidin

Zur Modulation des experimentellen Asthmas mittels des Demethylierungsreagenz 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5Aza) wurde das Protokoll nach Punkt 2.2 durchgeführt. Zusätzlich wurden die Tiere dreimal pro Woche, beginnend zwei Wochen vor der ersten Sensibilisierung bis zur ersten OVA-Provokation, mit einer Dosis von 0,2 mg/kg des Demethylierungsreagenz gelöst in PBS intraperitoneal behandelt (Abb. 2.2).

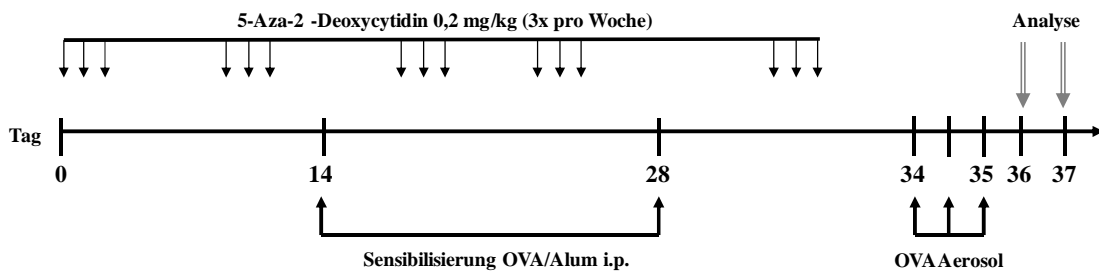


Abb. 2.2 Protokoll zur Modulation der allergischen Atemwegsentzündung mittels 5Aza

Zur Untersuchung des Einflusses von Methylierungsänderungen in T-Zellen in Bezug auf experimentelles Asthma wurde zusätzlich ein adoptiver Transfer von $CD4^{+}$ -T-Zellen 5Aza behandelter DO11.10-Mäuse durchgeführt. Dazu wurden DO11.10-Mäuse (Donoren) beginnend 14 Tage vor der ersten Sensibilisierung bis zum Transfer dreimal pro Woche mit 5Aza behandelt. Die erste Sensibilisierung fand an Tag 14 und die zweite an Tag 21 statt. An Tag 28 wurde den Donoren die Milz entnommen, mononukleäre Zellen (MNCs) isoliert und diese für 72h mit OVA (100 μ g/mL) restimuliert (s. 2.12.1-3). An Tag 31 wurden $CD4^{+}$ -T-Zellen aus den MNCs isoliert (s. 2.15.1) und 1×10^7 Zellen pro Maus in WT-Balb/c-Mäuse (Rezipienten), die 24h vor Transfer einmal OVA-Aerosol ausgesetzt waren, intravenös transferiert. Anschließend erfolgte eine wiederholte dreimalige Provokation der transferierten WT-Balb/c-Mäuse und deren endgültige Analyse (Abb. 2.3).

Chemikalien:

5-Aza-2'-Deoxycytidin	Sigma, Taufkirchen, D
PBS (Dublecco's Phosphate Buffered Saline)	PAA Laboratories, Pasching, A
OVA Grade VI (Sensibilisierung) und V (Aerosol)	Sigma, Taufkirchen, D
Inject Alum	Pierce, Rockford, USA

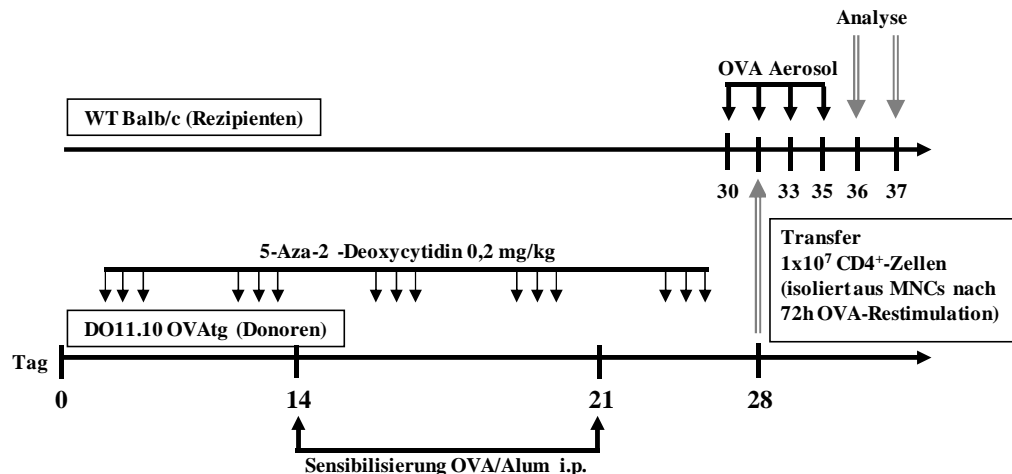


Abb. 2.3 Protokoll zum adoptiven Transfer von CD4⁺-T-Zellen 5Aza behandelter Mäuse

2.4 Pränatale Immunmodulation

Um den Einfluss des Stallstaubbakteriums *Acinetobacter lwoffii* F78 in der pränatalen Phase auf die Entwicklung des asthmatischen Phänotyp zu untersuchen, wurden narkotisierte weibliche Balb/c-Mäuse zwei Wochen lang jeweils an drei Tagen intranasal mit dem Bakterium behandelt. Dabei wurde jeweils eine Dosis von 10^8 Bakterien in 50 μ L PBS verabreicht. Die Narkose erfolgte durch subkutan (s.c.) Injektion von 200 μ L Ketanest (76 mg/kg) / Rompun (9,6 μ g/kg). Anschließend wurden die Tiere vier Tage mit Balb/c-Männchen verpaart und über die Tragzeit von ca. 21 Tagen weiterhin dreimal pro Woche mit dem jeweiligen Bakterium behandelt. Als Kontrolle erfolgte die Behandlung ausschließlich mit PBS.

Die weiblichen Nachkommen der behandelten Tiere wurden nach Durchführung des Protokolls der allergischen Atemwegsentzündung analysiert. Die Sensibilisierung erfolgte hier im Alter von 25 und 39 Tagen. Im Alter von 44-46 Tagen wurden die Nachkommen jeweils für 20 min einem OVA-Aerosol ausgesetzt. Die Lungenfunktionsanalyse und endgültige Analyse fanden im Alter von 47 und 48 Tagen statt (Abb. 2.4).

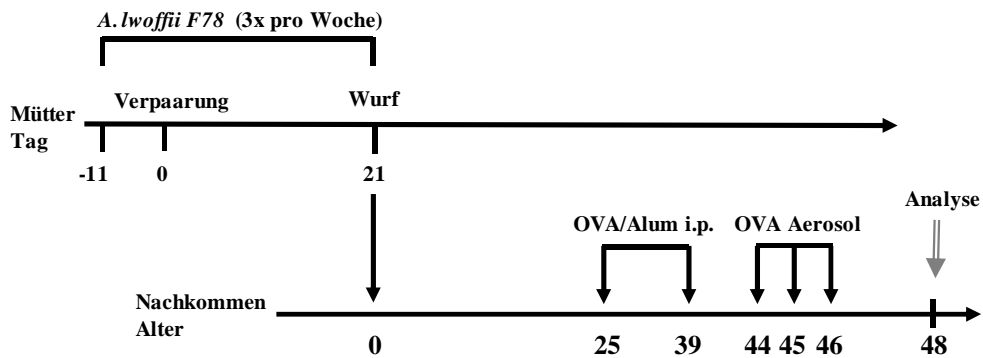


Abb. 2.4 Protokoll zur pränatalen Immunmodulation durch Stallstaubbakterien

In weiteren Experimenten wurden die Nachkommen *A. lwoffii* F78 exponierter Mütter noch zusätzlich im Alter von 43, 44, 45 und 46 Tagen mit einem anti-IFN γ -Antikörper (100 μ g / Tier i.v.) oder einem HAT-Inhibitor (Garcinol: 0,2 mg/kg Körpergewicht i.p.) behandelt, wobei an den Tagen 44, 45 und 46 die Behandlung jeweils 30 Minuten vor der OVA-Aerosol-Provokation erfolgte.

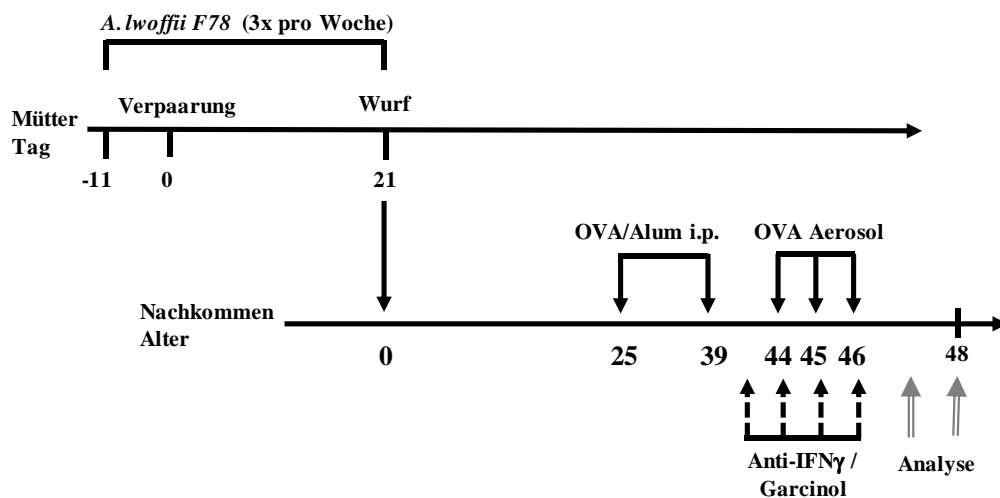


Abb. 2.5 Protokoll der anti-IFN γ - und Garcinol-Behandlung

Chemikalien:

Acinetobacter lwoffii F78

PBS (Dublecco's Phosphate Buffered Saline)

Ketanest

Rompun

OVA GradeVI (Sensibilisierung) und V (Aerosol)

Inject Alum

aIFN γ -Antikörper

Garcinol

Forschungszentrum Borstel, D

PAA Laboratories, Pasching, A

Pfizer, Berlin, D

Bayer, Leverkusen, D

Sigma, Taufkirchen, D

Pierce, Rockford, USA

R&D Systems, Minneapolis, USA

Enzo Life Sciences, Lörrach, D

2.5 *Ex vivo und in vivo* Proliferationsassay mittels CFSE

Zum Ausschluss der Zytotoxizität des Demethylierungsreagenz 5Aza und des HAT-Inhibitors Garcinol, wurde die Proliferation von T-Zellen nach jeweiliger Behandlung analysiert. Dazu wurden zum einen weibliche Balb/c-Mäuse an den Tagen 0, 2, 4, 7, 9, 11 und 13 (5Aza: 0,2 mg/kg Körpergewicht i.p.) bzw. 0, 2, 4 und 6 (Garcinol 0,2 mg/kg Körpergewicht i.p.) mit dem jeweiligen Reagenz behandelt. 24 h nach der letzten Behandlung erfolge die Analyse der Tiere, wobei die Proliferationsfähigkeit der T-Zellen aus der Milz mittels CFSE (s. 2.14) bestimmt wurde. Zum anderen wurde die Proliferationsfähigkeit von T-Zellen direkt im Tier bestimmt. Dazu wurden 1×10^7 mit CFSE markierte CD4⁺-T-Zellen intravenös in SCID-Mäuse transferiert und die Tiere anschließend an den Tagen 1, 3, 5 und 7 mit der entsprechenden Dosis 5Aza bzw. Garcinol behandelt. Die Bestimmung der T-Zell-Proliferation erfolgte an Tag 8 mittels FACS-Analyse der Milzzellen.

Chemikalien:

5-Aza-2'-Deoxycytidin

Sigma, Taufkirchen, D

Garcinol

Enzo Life Sciences, Lörrach, D

PBS (Dublecco's Phosphate Buffered Saline)

PAA Laboratories, Pasching, A

2.6 *Head-out Body-Plethysmographie*

Die Head-out Body-Plethysmographie ermöglicht die Messung verschiedener Lungenfunktionsparameter wie dem halbmaximalen expiratorischen bzw. inspiratorischen Atemfluss, dem Atemzugvolumen, der Expirations- bzw. Inspirationszeit sowie der Atemfrequenz am spontan atmenden, nicht anästhesierten Tier.

Exponiert man sensibilisierte Tiere während der Messung mit dem Bronchiokonstriktor Methacholin (MCh), so kommt es zu einer Veränderung im Atemfluss der Tiere, wobei asthmatische Tiere empfindlicher reagieren und somit im Vergleich zu nicht asthmatischen Tieren bereits bei geringeren MCh-Dosen eine 50%ige Reduktion des Atemflusses zeigen.

Während der Messung befindet sich der Rumpf der Maus im luftdicht geschlossenen Plethysmographen und der Kopf ragt durch eine Halskrause in die Expositions-kammer. So führen die bei der Atmung der Maus auftretenden Thoraxbewegungen zu einer Volumenänderung im Plethysmographen und der dadurch entstehende Luftstrom wird von

einem Pneumotachographen gemessen. Die Auswertung erfolgte mit der Software NOTOCORD hem 3.5.

Zu Beginn einer Messung wurde zunächst die Baseline ermittelt. In dieser Zeit atmet die Maus ca. 4000mal ein und aus. Alle in dieser Zeit aufgenommenen Werte wurden gemittelt und für jeden Mittelwert der Wert 100 festgelegt. Entsprechende Veränderungen gegenüber diesen Kontrolldaten wurden als prozentuale Abweichungen von der Baseline erfasst. Die Messung begann unter Zugabe des Bronchiokonstriktors MCh, welches in PBS gelöst alle fünf Minuten für jeweils 70 Sekunden in der Expositions-kammer vernebelt wurde, während die Lungefunktionsparameter weiterhin kontinuierlich aufgenommen wurden. Dabei wurden ansteigende Konzentrationen von MCh verwendet: 0 mg/mL, 12,5 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL, 75 mg/mL und 100 mg/mL.

Unter Provokation mit MCh nimmt die Verengung der Atemwege zu und somit der Atemfluss ab. Die MCh-Konzentration, bei der eine 50%ige Verminderung des Atemflusses erreicht wird gilt als Maß für die Reagibilität der glatten Atemwegsmuskulatur.

Chemikalien:

PBS (Dublecco's Phosphate Buffered Saline)
 β -Methyl-Acetylcholin (Methacholin, MCh)

PAA Laboratories, Pasching, A
Sigma, Taufkirchen, D

Material:

Glasexpositions-kammer

Forschungswerkstätten,
Medizinische Hochschule Hannover, D

Pneumotachographen PTM 378/1.2

Hugo-Sachs-Elektronik,
March-Hugstetten, D

NOTOCORD hem 3.5 Software

Notocord, Paris, F

2.7 Broncho-alveoläre Lavage (BAL)

Die Broncho-alveoläre Lavage dient zur Gewinnung von Zellen, die in das Lumen der Atemwege eingewandert sind. Weiterhin werden sämtliche Proteine die sich in diesem Kompartiment befinden herausgespült. Zunächst wurde die Trachea freipräpariert und eine kleine Öffnung hineingeschnitten. Durch diese wurde ein Venenverweilkatheter in die Trachea geschoben und anschließend 1 mL PBS mit Protease-Inhibitor in die Lunge appliziert und sofort wieder entnommen. Die Zellsuspension wurde im Anschluss zentrifugiert (300xg, 10 min), der zellfreie Überstand abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Chemikalien:

PBS (Dublecco's Phosphate Buffered Saline)	PAA Laboratories, Pasching, A
Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche, Mannheim, D

Material:

Vasofix Venenverweilkatheter	Braun, Melsungen, D
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Hereaus, Osterode, D

2.7.1 Zellzählung und Differenzierung von Leukozytensubpopulationen

Das BAL-Pellet wurde in 1 mL PBS/1% BSA aufgenommen und die Zellzahl mittels CASY[®]TT Zählsystem bestimmt, wobei die jeweilige Probe im Verhältnis 1:100 mit CASY[®]Ton verdünnt wurde.

Zur Differenzierung der Leukozytensubpopulationen wurden 50 µL Probe mit 150 µL PBS/1% BSA verdünnt und anschließend eine Zytozentrifugation für 5 Minuten bei 320xg durchgeführt, wobei die in der Probe befindlichen Zellen auf einen Objektträger zentrifugiert werden. Die Präparate wurden anschließend an der Luft getrocknet und mit einer Diff-Quick[®]Lösung gefärbt. Die Zelldifferenzierung erfolgte lichtmikroskopisch bei 400-facher Vergrößerung anhand morphologischer Kriterien.

Chemikalien:

PBS (Dublecco's Phosphate Buffered Saline)	PAA Laboratories, Pasching, A
BSA Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe, D
Färbelösungen (Diff-Quick [®])	Dade-Behring, Marburg, D
CASY [®] Ton	Schärfe Systems, Reutlingen, D

Material:

Zytozentrifuge (Cytospin 3)	Shandon, Frankfurt a. M., D
Probenkammer	Shandon, Frankfurt a. M., D
Zytoklip	Shandon, Frankfurt a. M., D
Objektträger (76 x 26 mm Matrand)	Menzel GmbH, Braunschweig, D
Mikroskop (BH2)	Olympus, Hamburg, D
CASY [®] Model TT (Cell-Counter)	Schärfe Systems, Reutlingen, D

2.8 Lungenhistologie

Zur morphologischen Untersuchung der Lunge erfolgte eine histologische Analyse des Organs. Dazu wurde die Lunge in situ über die Trachea mit Paraformaldehyd (6%) gefüllt und anschließend in Paraformaldehyd (6%) fixiert. Es folgte die Einbettung der Organe

zunächst in Agarose und anschließend in Paraffinblöcke, von denen 3 µm dicke Schnitte mittels Mikrotom angefertigt wurden.

Entparaffinierte Schnitte wurden mittels Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt, was einen histologischen Gesamtüberblick ermöglicht. Dabei werden im ersten Schritt die Kerne mit Hämatoxylin nach Gill gefärbt und erscheinen dunkelviolett bis schwarz. In einem zweiten Schritt erfolgt eine Gegenfärbung mit Eosin (2%), wobei Zytoplasma, Kollagen, Keratin und Erythrozyten rot gefärbt werden. Um speziell eine vermehrte Mukusproduktion in den Atemwegen nachweisen zu können, wurden weiterhin Schnitte mittels Periodsäure-Schiff-Färbung (PAS) angefärbt. Dabei oxidiert Periodsäure 1,2-Glykole in unsubstituierten Polysacchariden, neutralen Mukopolysacchariden sowie Muko- und Glykoproteinen zu Aldehydgruppen, welche mit dem Schiff-Reagenz eine leuchtend rote Farbreaktion ergeben. Durch diese Reaktion lassen sich die oben aufgeführten Mukusbestandteile spezifisch anfärben und mittels Computeranalyse semiquantitativ analysieren.

Chemikalien:

Paraformaldehydlösung (6%ig)	Merck, Darmstadt, D
Färbelösung (Hämatoxylin II nach Gill)	Merck, Darmstadt, D
Färbelösung (Hämatoxylin III nach Gill)	Merck, Darmstadt, D
Färbelösung (Eosin G)	Merck, Darmstadt, D
Färbelösung (PAS-Färbekit)	Merck, Darmstadt, D

Material:

Objektträger (76 x 26 mm Mattrand)	Braunschweig, D
Mikrotom (Accu-Cut® SRMTM200 Rotary microtome)	Sakura, NL
Mikroskop (BX51)	Olympus, Hamburg, D
Auswertungssoftware Cell F	Olympus, Hamburg, D

2.9 Blutabnahme und Serumgewinnung

Zur Serumgewinnung wurde Blut aus der Schwanzvene der Tiere gewonnen. Dazu wurden diese für 10 Minuten in einen 50°C warmen Wärmeinkubator eingebracht, wodurch es zur Dilatation der peripheren Blutgefäße kam. Anschließend wurde die Schwanzvene mit einem Skalpell eingeritzt und das austretende Blut aufgefangen. Das maximal pro Maus entnommene Blutvolumen betrug 500 µL. Zur Gerinnung wurde das Blut mindestens eine Stunde bei RT inkubiert und anschließend bei 4000 rpm und 4°C für 20 Minuten zentrifugiert. Der Serumüberstand wurde abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Material:

Wärmeinkubator GTR 199

Greisinger, Landsberg, D

Skalpell (Disposable Scalpell No. 10)

Feather, J

Zentrifuge Megafuge 1.0R

Hereaus, Osterode, D

2.10 May-Grünwald-Giemsa-Färbung von Blutausstrichen

Zur Herstellung von Blutausstrichen wurde ein Tropfen Blut auf einen Objektträger gegeben und mittels eines zweiten Objektträgers erfolgte ein gleichmäßiges Ausstreichen des Tropfens. Die luftgetrockneten Blutausstriche wurden anschließend für 3 min mit May-Grünwald-Lösung gefärbt, 3 min mit VE-Wasser gewaschen und für 15 min mit Giemsa-Lösung gefärbt. Die Zelldifferenzierung der luftgetrockneten Präparate erfolgte lichtmikroskopisch bei 400-facher Vergrößerung anhand morphologischer Kriterien, wobei 100 Zellen pro Objektträger differenziert wurden.

Chemikalien:

May-Grünwald-Färbelösung

Merck, Darmstadt, D

Giemsa-Färbelösung

Roth, Karlsruhe, D

Material:

Objektträger (76 x 26 mm Mattrand)

Menzel GmbH, Braunschweig, D

Mikroskop (BH2)

Olympus, Hamburg, D

2.11 Konzentrationsbestimmung von OVA-spezifischem IgE, IgG₁ und IgG_{2a} sowie von gesamt IgE im Serum mittels Enzyme-linked Immunosorbant Assay (ELISA)

Die ELISA-Technik dient der quantitativen Bestimmung von Antigen- bzw. Antikörperkonzentrationen. Der hier durchgeführte Test ist ein Sandwich-ELISA, bei dem ein spezifisches Antigen (OVA) oder ein anti-IgE Antikörper an eine Oberfläche gebunden wird. Die freien Bindungsstellen werden abgeblockt und durch Zugabe der Proben erfolgt eine spezifische Bindung der in der Probe enthaltenen Antikörper an das gebundene Antigen. Die gebundenen Antikörper werden in einem zweiten Schritt von einem spezifischen biotinyliertem Sekundärantikörper immunkomplexiert. Danach erfolgt die Bindung eines Streptavidin-Peroxidase-Komplexes, der nach Zugabe eines Substrates, dieses in einer Farbreaktion umsetzt, so dass eine photometrische Auswertung erfolgen kann.

2.11.1 Immunglobulin-ELISA

Für den ELISA wurde eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit OVA bzw. anti-Mouse-IgE in NaHCO_3 pH 8,3 über Nacht bei 4°C beschichtet (50 µL/Well). Nach viermaligem Waschen mit PBS/0,1% Tween 20 wurden unspezifische Bindungsstellen durch die Zugabe von 150 µL Blockpuffer (PBS/1% BSA) abgesättigt (2 h bei RT auf Schüttler). Nach erneutem viermaligen Waschen wurden der Standard und die verdünnten Proben (50 µL/Well) aufgetragen und für 2 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert.

Durch einen entsprechenden Waschvorgang wurde überschüssiges Material entfernt und der biotinylierte Sekundärantikörper (50 µL/Well) aufgetragen und ebenfalls für 2 h bei RT inkubiert. Die überschüssigen Sekundärantikörper wurden durch viermaliges Waschen entfernt und dann 50 µL/Well des 1:1000 verdünnten Streptavidin-Peroxidase-Komplexes aufgetragen (30 Minuten, RT im Dunkeln). Anschließend erfolgte ein achtmaliger Waschschrift und die Zugabe von 100 µL/Well Substratlösung. Dann schloss sich eine Inkubation im Dunkeln an, bis die Abstufungen der Standardverdünnungen deutlich unterscheidbar waren. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Reaktion mit 50 µL 2 M Schwefelsäure gestoppt, was zu einem Farbumschlag von blau nach gelb führte. Es folgte die photometrische Messung der Platte bei 450 nm und die Auswertung der Messdaten mit Hilfe der Photometersoftware Magellan.

Tab. 2.1 AK-Konzentrationen und Verdünnungsfaktoren für Ig-ELISAs

ELISA	Konzentration OVA / Beschichtungs-AK	Konzentration Detektions-AK	Konzentration 1. Standard	Verdünnungsfaktor Proben
OVA-IgE	20 µg/mL	2,5 µg/mL	200 ng/mL	1:10
OVA-IgG ₁	0,4 µg/mL	2,5 µg/mL	50 ng/mL	1:10.000
OVA-IgG _{2a}	20 µg/mL	2,5 µg/mL	10 ng/mL	1:2000
gesamt IgE	10,6 µg/mL	2,5 µg/mL	250 ng/mL	1:10

Chemikalien:

OVA-IgE

OVA Grade VI	Sigma, Taufkirchen, D
IgE-Antikörper Standard	Serotec, Oxford, UK
Anti-Mouse-IgE-Biotin (2. AK)	BD, San Diego, USA

OVA-IgG1

OVA Grade VI	Sigma, Taufkirchen, D
Anti-OVA IgG1 (Standard)	Sigma, Taufkirchen, D
Anti-Mouse-IgG ₁ -Biotin (2. AK)	BD, San Diego, USA

OVA-IgG2a

OVA Grade VI	Sigma, Taufkirchen, D
Antiovalbumin chicken (Standard)	AntibodyShop, Gentofte, DK
Anti-Mouse-IgG _{2a} -Biotin (2. AK)	BD, San Diego, USA

Gesamt IgE

Anti-Mouse-IgE (1. AK)	BD, San Diego, USA
Monoklonales Maus IgE (Standard)	BD, San Diego, USA
Anti-Mouse-IgE-Biotin (2. AK)	BD, San Diego, USA

PBS (Dulbecco's Phosphate-buffered Saline)

Biochrom AG, Berlin, D

BSA Albumin Fraktion V

Roth, Karlsruhe, D

Tween 20

Roth, Karlsruhe, D

Streptavidin/Peroxidase

Sigma, Taufkirchen, D

BM blue POD Substrat

Roche, Mannheim, D

Schwefelsäure (H₂SO₄)

Merck, Darmstadt, D

Material:

96-Well-Mikrotiterplatte Maxisorp Flachboden

Nunc, Wiesbaden, D

ImmunoTMwash 12 Mikrotiterplatten-Washer

Nunc, Wiesbaden, D

Mikrotiterplattenreader Sunrise

Tecan, Crailsheim, D

Auswertungssoftware Magellan

Tecan, Crailsheim, D

2.12 Konzentrationsbestimmung von Zytokinen aus Überständen von Lymphozytenkulturen mittels ELISA

2.12.1 Gewinnung primärer Zellen aus Milz und Lymphknoten

Zur Gewinnung von Zellen aus Milz und Lymphknoten wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet und anschließend die Milz und die drainierenden LK der Lunge entnommen. Milz und LK wurden jeweils in eiskaltem RPMI-Medium aufgenommen und mit Hilfe eines Spitzenstempels und Zugabe von 5 mL Medium durch ein Nylonsieb gedrückt. Die so entstandene Zellsuspension wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Chemikalien:

RPMI 1640 Komplettmedium:

RPMI 1640 (1x) ohne L-Glutamin	PAA Laboratories, Pasching, A
FCS Gold	PAA Laboratories, Pasching, A
Antimykotikum/Antibiotikum	PAA Laboratories, Pasching, A
L-Glutamin	PAA Laboratories, Pasching, A

Material:

Präparierbesteck

Kobe, Marburg, D

Zellsieb 100 µm

BD, Heidelberg, D

2.12.2 Isolierung von mononukleären Zellen

Die aus der Milz hergestellte Zellsuspension enthält neben den mononukleären Zellen (MNCs) auch diverse andere Gewebebestandteile. Um die MNCs, zu denen Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen gehören, aus der Zellsuspension zu isolieren, wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Das hierfür verwendete Dichte-Separationsmedium Lympholyte-M wurde speziell für die Isolation von lebenden Lymphozyten aus murinen Zellsuspensionen entwickelt.

Zur Durchführung wurde Lympholyte vorsichtig mit der Zellsuspension im Verhältnis 1+1 überschichtet. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 1200xg für 20 min ohne Bremse, bei dem sich die MNCs in der Interphase anreicherten. Zellen mit einer höheren Dichte als Lympholyte (Erythrozyten, Granulozyten, Epithelzellen) bildeten ein Pellet.

Die Zellen der Interphase wurden vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und verbliebenes Lympholyte durch dreimaliges Waschen mit 10 ml RPMI-Medium (Zentrifugation 10 Minuten bei 350xg) vollständig entfernt. Die so erhaltenen MNCs wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

Die aus den Lymphknoten hergestellte Zellsuspension wurde nicht über einen Gradienten aufgereinigt, da bei der geringen Zellzahl der Verlust an Zellmaterial zu hoch gewesen wäre.

Chemikalien:

RPMI 1640 Komplettmedium

PAA Laboratories, Pasching, A

Lympholyte-M

Cedarlane, Hornby, CAN

Material:

Zentrifuge Megafuge 1.0R

Heraeus, Osterode, D

15 mL Reaktionsgefäß

Sarstedt, Newton, USA

2.12.3 Kurzzeitstimulation der MNCs

Die MNCs aus Milz und Lymphknoten wurden mit einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/mL in eine 48-Well-Platte (Milz: 1 mL/Well) bzw. eine 96-Well-Platte

(LK: 200 μ L/Well) ausgesät und mit anti-CD3 (0,5 μ g/mL) / anti-CD28 (2 μ g/mL) für 24 h bzw. mit OVA (50 μ g/mL) für 72 h bei 37°C stimuliert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

Chemikalien:

RPMI 1640 Komplettmedium	PAA Laboratories, Pasching, A
OVA Grade VI	Sigma, Taufkirchen, D
Hamster anti-mouse-CD3 / -CD28	BD, San Diego, USA

Material:

96-Well-Platte	Nunc, Roskilde, DK
48-Well-Platte	Nunc, Roskilde, DK
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Hereaus, Osterode, D

2.12.4 Zytokin-ELISA

Mit den Proben aus der Kurzzeitstimulation wurde ein Sandwich-ELISA nach dem unter 2.11 beschriebenen Prinzip durchgeführt:

Eine Flachboden 96-Well-Mikrotiterplatte wurde mit einer Lösung aus 50 μ L/Well Primärantikörper in 0,1 M NaHCO₃ pH 8,2 über Nacht bei 4°C beschichtet. Die Lösung wurde verworfen und die Platte viermal mit Waschpuffer (PBS/0,1% Tween 20) gewaschen. Anschließend erfolgte eine Absättigung der freien Bindungsstellen durch Zugabe von 150 μ L Blockpuffer (PBS/1% BSA) für 2 h bei RT. Nach viermaligem Waschen erfolgte die Inkubation mit dem Standard (höchster Standard s. Tab. 2.2: davon ausgehend eine geometrische Verdünnungsreihe um den Faktor 2) und den Proben. Danach erfolgte das Auftragen von 50 μ L dieser Proben und eine Inkubation für 2 Stunden bei RT auf dem Schüttler. Nach erneutem viermaligem Waschen wurde der Sekundärantikörper aufgetragen und für zwei Stunden bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Es folgten vier Waschschritte, nach denen 50 μ L des 1:1000 in Waschpuffer verdünnten Streptavidin-Peroxidase-Komplexes zugegeben und für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert wurde. Nach acht Waschschritten wurden pro Well 100 μ L Substratlösung (BM Blue POD) aufgetragen und so lange im Dunkeln inkubiert, bis die Abstufungen der Standardverdünnungen deutlich zu unterscheiden waren. Die eingetretene Farbreaktion wurde durch Zugabe von 50 μ L 2 M Schwefelsäure gestoppt, was einen Farbumschlag von blau zu gelb bewirkte, dessen Absorption bei 450 nm mit einem Photometer gemessen wurde. Die Auswertung der Messdaten erfolgte unter Zuhilfenahme der Photometersoftware Magellan.

Tab. 2.2 AK-Konzentrationen und Verdünnungsfaktoren für Zytokin-ELISAs

ELISA	Konzentration Beschichtungs-AK	Konzentration Detektions-AK	Konzentration 1. Standard	Verdünnungsfaktor Proben
IFN γ	3 μ g/mL	1 μ g/mL	10.000 pg/mL	1:2
IL-4	0,5 μ g/mL	1 μ g/mL	4 ng/mL	1:2
IL-5	1 μ g/mL	2 μ g/mL	4000 pg/mL	1:2
IL-13	4 μ g/mL	0,1 μ g/mL	500 pg/mL	1:2

Chemikalien:

IFN γ

Purified rat anti-mouse IFN- γ (1. AK)	BD, San Diego, USA
Recombinant mouse IFN- γ (Standard)	BD, San Diego, USA
Biotinylated anti-mouse IFN- γ (2. AK)	BD, San Diego, USA

IL-4

Purified rat anti-mouse IL-4 (1. AK)	BD, San Diego, USA
Recombinant mouse IL-4 (Standard)	BD, San Diego, USA
Biotinylated anti-mouse IL-4 (2. AK)	BD, San Diego, USA

IL-5

Purified rat anti-mouse/human IL5 (1. AK)	BD, San Diego, USA
Recombinant mouse IL-5 (Standard)	BD, San Diego, USA
Biotinylated rat anti-mouse IL-5 (2. AK)	BD, San Diego, USA

Mouse IL-13 Cytoset	Invitrogen, Karlsruhe, D
PBS (Dulbecco's Phosphate-buffered Saline)	Biochrom AG, Berlin, D
BSA Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe, D
Tween 20	Roth, Karlsruhe, D
Streptavidin/Peroxidase	Sigma, Taufkirchen, D
BM blue POD Substrat	Roche, Mannheim, D
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt, D
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Merck, Darmstadt, D

Material:

96-Well-Mikrotiterplatte Maxisorp Flachboden	Nunc, Wiesbaden, D
Immuno TM wash 12 Mikrotiterplatten-Washer	Nunc, Wiesbaden, D
Mikrotiterplattenreader Sunrise	Tecan, Crailsheim, D
Auswertungssoftware Magellan	Tecan, Crailsheim, D

2.13 Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, das auf der Erfassung von Reflexions- und Streulichtphänomenen beruht. Diese entstehen indem Licht definierter Wellenlängen auf Fluoreszenzfarbstoffe trifft und diese zur Emission charakteristischer elektromagnetischer Wellen anregt, die detektiert werden können. Diese Fluoreszenzfarbstoffe sind an

Antikörper gekoppelt, die an die jeweiligen Antigene spezifisch binden können. Antigene können hierbei Oberflächenmerkmale von Immunzellen, aber auch intrazelluläre Proteine wie Zytokine und Transkriptionsfaktoren sein.

2.13.1 Oberflächenfärbung

Zur Oberflächenfärbung wurden die Zellen (ca. 1×10^6) zunächst in 1 mL FACS-Puffer (PBS/1%BSA) gewaschen (300xg, 5 min, 4°C). Das Pellet wurde anschließend in 50 μ L FACS-Puffer resuspendiert und 0,5 μ L des jeweiligen Antikörpers und 1 μ L Mausserum hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation von 15 min im Dunkeln bei 4°C. Danach wurden die Zellen erneut zweimal mit je 1 mL FACS-Puffer gewaschen in 300 μ L CellFix aufgenommen und am FACSort analysiert.

Chemikalien:

FACS-Puffer:

PBS (Dulbecco's Phosphate-buffered Saline)	Biochrom AG, Berlin, D
BSA	Roth, Karlsruhe, D

Antikörper:

Anti-mouse-CD4 (APC)	BD, San Diego, USA
Anti-mouse-DO11.10 (PE)	BD, San Diego, USA

Isotyp-Antikörper:

Rat-IgG2a, Isotype control	BD, San Diego, USA
Hamster-IgG, Isotype control	BD, San Diego, USA

Material:

FACS-Röhrchen	Sarstedt, Newton, USA
FACSort	BD, San Diego, USA
Software Cell Quest Pro	BD, San Diego, USA

2.13.2 Foxp3-Intrazellulär-Färbung

Zur Intrazellulär-Färbung werden Zellmembran und Kernmembran permeabilisiert, wodurch der Transkriptionsfaktor Foxp3 dem gegen ihn gerichteten fluoreszenzmarkierten Antikörper zugänglich gemacht wird. Zur Durchführung wurde das „Foxp3-Staining-Buffer-Set“ von eBioscience verwendet. Dazu wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt, einmal mit FACS-Puffer (PBS/1%BSA) gewaschen und die Oberflächenfärbung (CD4-APC, CD25-FITC) nach Punkt 2.13.1 durchgeführt. Danach wurden die Zellen in 200 μ L Fix/Perm-Lösung (1 Teil FixPerm-Konzentrat + 3 Teile

FixPerm-Diluent) resuspendiert und 30 min bei 4°C unter Lichtausschluss inkubiert. Es folgte ein zweimaliger Waschschrift mit 500 µL Perm-Puffer (1:10 in VE-Wasser) und ein einmaliger mit 500 µL FACS-Puffer. Anschließend wurden die Zellen in 50 µL Fc-Block (1:100 in FACS-Puffer) aufgenommen. Nach einer 15minütigen Inkubation auf Eis wurden 50 µL einer Foxp3-Antikörper-Lösung (1:100 in FACS-Puffer) zugefügt und erneut für 15 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgte ein zweimaliges Waschen mit FACS-Puffer und die Aufnahme des Pellets in 300 µL CellFix. Die Analyse der Zellen wurde am FACSort durchgeführt, wobei jeweils 50.000 Zellen analysiert wurden.

Chemikalien:

Foxp3-Staining-Buffer-Set	eBioscience, SanDiego, USA
---------------------------	----------------------------

FACS-Puffer:

PBS (Dulbecco's Phosphate-buffered Saline)	Biochrom AG, Berlin, D
--	------------------------

BSA	Roth, Karlsruhe, D
-----	--------------------

Antikörper:

PE-anti-Foxp3	eBioscience, San Diego, USA
---------------	-----------------------------

Fc-Block (anti-CD16/CD32)	BD, SanDiego, USA
---------------------------	-------------------

Isotyp-Antikörper:

Hamster-IgG, Isotype control	BD, San Diego, USA
------------------------------	--------------------

Material:

FACS-Röhrchen	Sarstedt, Newton, USA
---------------	-----------------------

FACSort	BD, San Diego, USA
---------	--------------------

Software Cell Quest Pro	BD, San Diego, USA
-------------------------	--------------------

2.14 CFSE Proliferationsassay

Um die Proliferationsfähigkeit von Zellen mittels CFSE zu bestimmen, wurden MNCs isoliert (s. 2.12.1-2) und mit CFSE markiert. Durch Zellteilung nimmt der Gehalt an CFSE in den Zellen ab, wodurch die Proliferation mittels FACS dargestellt werden kann. Dazu wurden die Zellen einmal in PBS gewaschen (300xg, 10 min) und in einer 37°C warmen Lösung aus PBS mit CFSE aufgenommen (1×10^7 Zellen/mL mit einer finalen CFSE-Konzentration von 1 µM). Es folgte eine Inkubation von 15 min bei 37°C. Anschließend wurde die Zellsuspension mit Medium (mit FCS) aufgefüllt und ein Zentrifugationsschritt (300xg, 10 min) angeschlossen. Das so erhaltene Pellet wurde in 10 mL Medium resuspendiert und erneut bei 37°C für 5 min inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen einmal mit Medium gewaschen, auf 2×10^6 Zellen/mL eingestellt und 500 µL/Well einer

48-Well-Platte ausgesät. Die ausgesäten Zellen wurden anschließend mit anti-CD3 (0,5 µg/mL) und anti-CD28 (2 µg/mL) stimuliert und nach 0 h, 6 h, 24 h, 48 h und 72 h die Proliferation mittels FACS bestimmt, wobei zusätzlich CD4⁺-T-Zellen mittels fluoreszenzmarkiertem Antikörper gefärbt wurden.

Chemikalien:

Vybrant CFDA-SE Cell Tracer Kit	Molecular Probes, Eugene, USA
Hamster anti-mouse-CD3 und -CD28	BD, San Diego, USA
Anti-mouse-CD4-APC	BD, San Diego, USA
RPMI 1640 Komplettmedium	PAA Laboratories, Pasching, A
PBS (Dublecco's Phosphate Buffered Saline)	PAA Laboratories, Pasching, A

Material:

48-Well-Platte	Nunc, Roskilde, DK
FACSort	BD, San Diego, USA
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Newton, USA
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Hereaus, Osterode, D

2.15 Zellseparation mittels Magnet-Bead-Technologie

Das Prinzip der Zellseparation mittels Magnet-Bead-Technologie beruht darauf, das Zellen über Antikörper an magnetische Beads gekoppelt werden. Die auf diese Art mit magnetischen Eigenschaften versehen Zellen können so mit Hilfe eines starken Magneten von anderen Zellen getrennt werden.

2.15.1 CD4⁺-T-Zellen aus der Milz

Zur Aufreinigung CD4⁺-T-Zellen aus der Milz wurde das CD4 negative Isolation Kit von Invitrogen nach Herstelleranleitung verwendet. Nach der Aufreinigung wurden die Zellen pelletiert und das Pellet in 1 mL PBS aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen zu intravenösen Applikation auf 1×10^7 Zellen / 200 µL PBS eingestellt und transferiert.

2.15.2 CD4⁺CD25⁻-T-Zellen aus der Milz

Zur Negativaufreinigung von CD4⁺CD25⁻-T-Zellen aus der Milz wurde das CD4⁺CD25⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit von Miltenyi Biotec nach Herstelleranleitung verwendet. Die auf diese Weise isolierten Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert (300xg,

10 min) und je nach anschließender Verwendung in ATL-Puffer oder TriFast aufgenommen. Zusätzlich wurde die Effizienz der Aufreinigung mittels FACS bestimmt.

Chemikalien:

CD4 negative Isolation Kit	Invitrogen, Karlsruhe, D
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit	Miltenyi, Bergisch Gladbach, D
MACS-Puffer:	
PBS (Dulbecco's Phosphate-buffered Saline)	Biochrom AG, Berlin, D
FCS Gold	PAA Laboratories, Pasching, A
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Na ₂ EDTA)	Roth, Karlsruhe, D
ATL-Puffer	Qiagen, Hilden, D
peqGOLD TriFast	peqlab, Erlangen, D

Material:

LD-Columns	Miltenyi, Bergisch Gladbach, D
MS-Columns	Miltenyi, Bergisch Gladbach, D
MACS-Seperator	Miltenyi, Bergisch Gladbach, D
Dynalmagnet	Invitrogen, Karlsruhe, D
Rollschüttler	Kobe, Marburg, D
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Hereaus, Osterode, D

2.16 Bestimmung des CpG-Methylierungsgrades genomischer DNA

2.16.1 Pyrosequenzierung

Der CpG-Methylierungsgrad eines gewünschten DNA-Abschnitts kann mittels Pyrosequenzierung, einer Real-Time Sequenzier-Methode, bestimmt werden. Diese Methode beruht auf dem sequenziellen Einbau von Nukleotiden in eine durch einen Primer gesteuerte Polymerase-Extension. Nur wenn das zugefügte Nukleotid komplementär zur Template-DNA ist, wird es durch eine DNA Polymerase eingebaut, wodurch es zur Freisetzung von Pyrophosphat (PP_i) kommt. Das PP_i wird dann mit Hilfe eines enzymatischen Systems in ein bioluminometrisches Lichtsignal konvertiert (Abb. 2.6). Bei der Sequenzierung ist jeweils nur eines der vier Nukleotide im Reaktionsgefäß vorhanden und die biochemische Reaktion wird durch eine Mixtur von vier Enzymen durchgeführt: dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I, einer ATP-Sulfurylase, der Luciferase und der Apyrase. Um eine Degradation der Primer zu verhindern wird eine Exonuklease-defiziente DNA-Polymerase zum Nukleotid-Einbau verwendet. Das dadurch freigesetzte PP_i wird durch die ATP-Sulfurylase in ATP konvertiert, was wiederum die nötige Energie für die Luziferase liefert. Es kommt zur Oxidation von D-Luziferin in

Oxyluziferin. Das so entstandene Oxyluziferin befindet sich in einem angeregten Status, wodurch es zur Emission eines Photons ($\lambda = 560 \text{ nm}$) kommt. Dies wird durch eine *Charge-coupled device* (CCD) Kamera detektiert und als Peak in einem Pyrogramm dargestellt. Da das Nukleotid dATP ein natürliches Substrat für die Luziferase ist, wird hier die modifizierte Version α -S-dATP verwendet, die ohne Unterschied von der Polymerase eingebaut wird. Nicht eingebaute Nukleotide werden durch die Apyrase degradiert, bevor das nächste Nukleotid zugefügt wird.

Im so erhaltenen Pyrogramm kann dann der Methylierungsgrad für ein bestimmtes CpG-Motiv anhand der Ratio T / C bestimmt werden (Tost 2007).

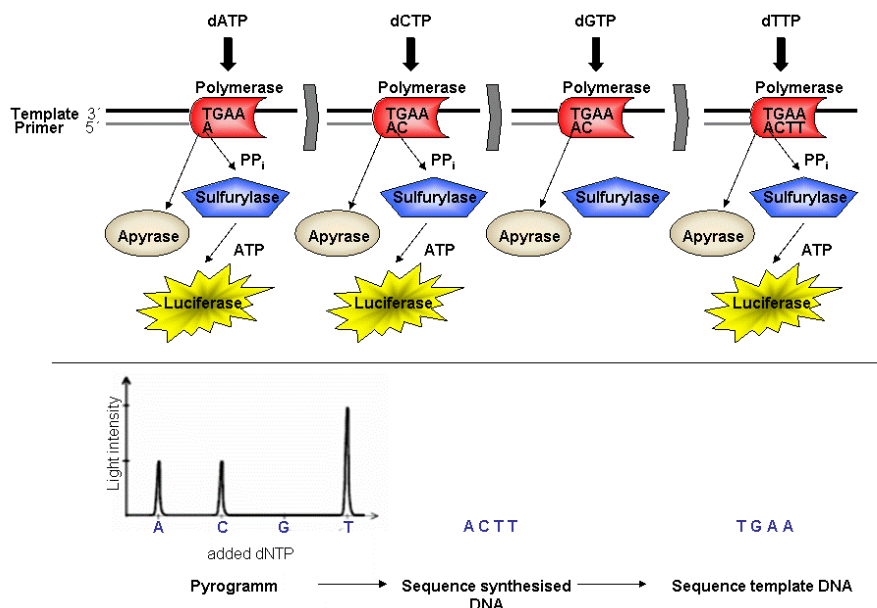


Abb. 2.6 Prinzip der Pyrosequenzierung (modifiziert nach Ahmadian 2005)

2.16.1.1 Bisulfit-Konversion genomischer DNA

Durch die Behandlung genomischer DNA (gDNA) mit Bisulfit erfolgt eine Konversion jedes nicht methylierten Cytosins in ein Uracil (nach PCR (s. 2.16.1.2): Thymin), während methylierte Cytosine nicht beeinflusst werden. Dieser Schritt ist nötig, um im weiteren Sequenzierschritt den Anteil von Cytosinen und Thyminen an einem spezifischen CpG-Lokus vergleichen zu können und so letztendlich den Methylierungsgrad bestimmen zu können. Zur Durchführung wurden zunächst 41 μL gDNA in ATL-Puffer mit 5 μL Proteinase K versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert, um das gesamte Protein aus der Probe zu entfernen. In einem weiteren Inkubationsschritt für 15 min bei 95°C wurde die Proteinase K denaturiert. Zur Denaturierung der gDNA wurden 5 μL 3 M NaOH zur

Probe hinzugefügt und für 20 min bei 42°C inkubiert. Nach der Denaturierung erfolgte die Zugabe von 450 µL Bisulfit (gesättigt) / Hydroquinon (10 mM)-Lösung (pH 5) und eine 3-4stündige Inkubation bei 55°C in Dunkeln. Die bisulfit-behandelte gDNA wurde anschließend mittels Wizard DNA Clean-Up Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt und in 50µL 1 mM Tris pH 8,0 eluiert. Die so erhaltene Bisulfit-DNA wurde dann zur Desulfonierung mit 5,5 µL 3 M NaOH versetzt und 20 min bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Fällung der Bisulfit-DNA durch Zugabe von 40 µL 7,5 M Ammonium-Acetat, 2 µL see-DNA und 300 µL Ethanol (100%) und eine mindestens 30minütige Inkubation bei -20°C. Durch einen Zentrifugationsschritt (20.000xg, 10 min, 4°C) wurde die so präzipitierte Bisulfit-DNA pelletiert, einmal mit Ethanol (70%) gewaschen und in 25µL 1 mM Tris pH 8,0 aufgenommen. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -20°C.

Chemikalien:

Proteinase K	Sigma, Taufkirchen, D
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, D
Sodium Bisulfite	Sigma, Taufkirchen, D
Hydroquinon	Sigma, Taufkirchen, D
Wizard DNA Clean-Up Kit	Promega, Madison, USA
TRIZMA-Base	Sigma, Taufkirchen, D
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, D
Ammoniumacetat (7,5 M)	Sigma, Taufkirchen, D
Ethanol	Roth, Karlsruhe, D
seeDNA	Invitrogen, Karlsruhe, D

Material:

Heizblock	Biozym, Hessisch Oldendorf, D
Vakuum-Absaug-Station	Qiagen, Hilden, D
Kühlzentrifuge BIOFUGE fresco	Heraeus, Osterode, D

2.16.1.2 Amplifikation der Bisulfit-DNA

Um eine ausreichende Menge an Template-DNA zur Sequenzierung herzustellen, wurde eine PCR durchgeführt. Hierbei war einer der zwei Primer am 5'-Ende biotinyliert. Da im anschließenden Sequenzierschritt sowohl der biotinylierte Template-Strang, als auch die nicht eingebauten biotinylierten Primer, an die Streptavidin-Sepharose Beads binden würden, wurde die PCR mit einer geringe Menge Primer (10 pmol/mL) und einer großen Anzahl Amplifikationszyklen (47) durchgeführt. Somit wurden die Primer in der Reaktion komplett aufgebraucht und konnten auch nicht mehr mit dem Sequenzierprimer

konkurrieren. Hier wurde die PCR mittels des HotStarTaq Master Mix Kits von Qiagen durchgeführt, dessen TaqPolymerase durch eine 15 Minuten dauernde Inkubation bei 95°C aktiviert wird. Pro Ansatz wurden 25 µL HotStarTaq Master Mix, 1 µL sense-Primer (10 pmol/µL), 1 µL antisense-Primer (10 pmol/µL, biotinyliert), 1µL Bisulfit-DNA und 22 µL Wasser zusammenpipettiert. Anschließend erfolgte im Thermocycler die Amplifikation der DNA-Abschnitte.

Das mittels der PCR generierte PCR-Produkt wurde anschließend durch Gelelektrophorese nachgewiesen. Dafür wurden 5 µL PCR-Produkt mit 1 µL Gel-Loading-Solution versetzt und dieser Ansatz auf ein 1,2%-iges Agarosegel, dem Ethidiumbromid zugesetzt wurde, aufgetragen. Als Laufpuffer diente Tris-Borat EDTA-Puffer (TBE-Puffer). Die Elektrophorese selbst wurde bei 100 V für eine Stunde durchgeführt. Anschließend wurde das Ergebnis mittels einer Gel-Dokumentations-Station visualisiert.

Programm für den Themocycler:

Aktivierungsschritt	15 Minuten	95°C	47 Zyklen
Denaturierung	40 Sekunden	94°C	
Annealing	40 Sekunden	X°C	
Extension	40 Sekunden	72°C	
Final Extension	10 Minuten	72°C	

Die Primersequenzen mit den entsprechenden Annealing-Temperaturen (X) sind in Punkt 2.20 aufgelistet.

Chemikalien:

HotStarTaq Master Mix Kit	Qiagen, Hilden, D
Gel-Loading-Solution Typ I	Sigma, Taufkirchen, D
GeneRuler DNA Ladder Mix	peqlab, Erlangen, D
ROTI® Agarose Ultra-Qualität	Roth, Karlsruhe, D
Ethidiumbromidlösung	Roth, Karlsruhe, D
TBE-Puffer	
TRIZMA Base	Sigma, Taufkirchen, D
Bor-Säure	Sigma, Taufkirchen, D
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Na ₂ EDTA)	Roth, Karlsruhe, D
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, D

Material:

Biometra TRIO-Thermoblock	Biometra, Göttingen, D
Gel Doc 2000	Bio Rad, München, D
Elektrophorese System	peqlab, Erlangen, D

2.16.1.3 Pyrosequenzierung

Als letzter Schritt zur Bestimmung des CpG-Methylierungsgrades erfolgte die Sequenzierung des PCR-Produkts mittels Pyrosequenzierung. Die nach der PCR erhaltene biotinylierte DNA wurde in eine 96-Well-PCR-Platte überführt, zur Immobilisation mit 4 µL Steptavidin-Sepharose Beads und 40 µL Bindepuffer versetzt und 10 min auf einem Schüttler bei RT inkubiert. Die nun an die Steptavidin-Sepharose Beads gebundene DNA wurde dann mittels „Vacuum Preparation Tool“ aus der Probe separiert und zur Einzelstrang-Bildung zunächst 10 Sekunden mit 70%igem Ethanol und anschließend mit 0,2 M Natronlauge gewaschen. Um alle Reste der Natronlauge zu entfernen erfolgte ein weiterer Waschschrift mit 1x Waschpuffer für 10 Sekunden. Daraufhin wurde die an die Steptavidin-Sepharose gebundene DNA in eine PSQ 96 Platte überführt, in deren Wells jeweils 1 µL Sequenzierprimer (10 pmol/µL) (s. 2.20) und 40 µL Annealingpuffer vorgelegt waren. Es schloss sich ein zweiminütiger Inkubationsschritt bei 82°C an. In der Abkühlphase erfolgte dann der Annealingschritt des Sequenzierprimers. Die nun fertig vorbereiten Proben wurden in den Pyrosequenzierer eingesetzt und die Reagenzien (Enzyme, Substrat und Nukleotide) in die PSQ 96 Patrone pipettiert. Das hier benötigte Volumen richtete sich nach der jeweiligen Sequenz und der Anzahl der Proben und wurde von der Q-CpG Software vorgegeben. Nach dem Einsetzen der PSQ 96 Patrone in das Gerät wurde die Analyse gestartet und nach oben beschriebenem Prinzip die Bestimmung des CpG-Methylierungsgrades für spezifische CpG-Motive durchgeführt.

Chemikalien:

PyroGold SQA Reagent Kit	Biotage, Uppsala, S
Steptavidin-Sepharose HP Beads	GE Healthcare, München, D
Annealingpuffer (pH 7,6) 20 mM Tris, 2 mM Mg-Acetat,	Biotage, Uppsala, S
Bindepuffer (pH 7,6) 10 mM Tris, 2 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% Tween20	Biotage, Uppsala, S
Waschpuffer (pH 7,6) 10 mM Tris	Biotage, Uppsala, S
Denaturierungslösung 0,2 M NaOH	Biotage, Uppsala, S
Ethanol	Roth, Karlsruhe, D

Material:

PyroMark ID (Pyrosequenzierer)	Biotage, Uppsala, S
Vacuum Preparation Tool	Biotage, Uppsala, S
PSQ 96 Platte	Biotage, Uppsala, S

PSQ 96 Reagenzien Patrone	Biotage, Uppsala, S
Q-CpG Software	Biotage, Uppsala, S
Heizblock	Biozym, Hessisch Oldendorf, D
Schüttler Variomag Teleshake	H+P, Oberschleissheim, D

2.16.2 Luminometric Methylation Assay

Der „Luminometric Methylation Assay“ (LUMA) ist eine Methode zur Bestimmung des genomweiten Methylierungsgrades. Sie basiert auf der DNA-Spaltung durch methylierungssensitive (HpaII) oder insensitive (MspI) Restriktionsenzyme in parallelen Reaktionen. Zusätzlich wird das Enzym EcoRI in allen Reaktionen als Referenz verwendet. Sowohl HpaII als auch MspI generieren 5'-CG Überhänge nach der enzymatischen Spaltung, während EcoRI 5'-AATT Überhänge produziert. Diese Überhänge werden dann in einem Polymerase-Extensions-Assay (Pyrosequenzierung s. 2.16.1) durch die schrittweise Zugabe von dNTPs aufgefüllt. Im ersten Schritt wird dATP zugegeben, im zweiten Schritt dGTP und dCTP, im dritten dTTP und im vierten Schritt nochmals dGTP und dCTP. Die aus der Zugabe von dATP und dTTP resultierenden Peaks repräsentieren die Spaltung durch EcoRI und sollten die gleiche Höhe haben. Hierbei dient der dTTP-Peak als Kontrolle für den dATP-Peak. Im zweiten Schritt werden dGTP und dCTP gleichzeitig in die Extensions-Reaktion hinzugefügt, wobei der korrespondierende Peak die MspI- oder HpaII-Spaltung repräsentiert. Im vierten Schritt werden diese Nukleotide erneut zugefügt als interne Kontrolle für die Komplettierung von Schritt 2. Es sollte kein erneuter Peak entstehen (Abb. 2.7).

Am Ende der Extensionsreaktion werden die Peakhöhen durch die zugehörige Software ermittelt und die Ratio HpaII / MspI unter Berücksichtigung von EcoRI als Referenz errechnet ($(\text{HpaII}/\text{EcoRI}) / (\text{MspI}/\text{EcoRI})$). Je kleiner der errechnete Wert hier ist, desto höher ist die relative genomweite Methylierung (Karimi 2006). Zur Durchführung wurden 2 x 500 ng DNA in einem Volumen von 17 µL aufgenommen. In den ersten Ansatz wurden 0,5 µL EcoRI, 0,5 µL HpaII und 2 µL Tango Puffer zugegeben, im zweiten Ansatz wurde statt HpaII MspI verwendet. Anschließend folgte eine Inkubation für 4 h bei 37°C. Nach dem Verdau wurde 20 µL Annealingpuffer zu den Proben zugegeben und der Ansatz auf eine PSQ 96 Platte übertragen. Die weiterhin benötigten Reagenzien wurden in die PSQ 96 Patrone pipettiert (50 µL dATP + 50 µL H₂O in Schacht A, 50 µL dTTP + 50 µL H₂O in Schacht T, 50 µL dCTP + 50 µL dGTP in Schacht C und 100 µL H₂O in Schacht G) und die Sequenzierung gestartet.

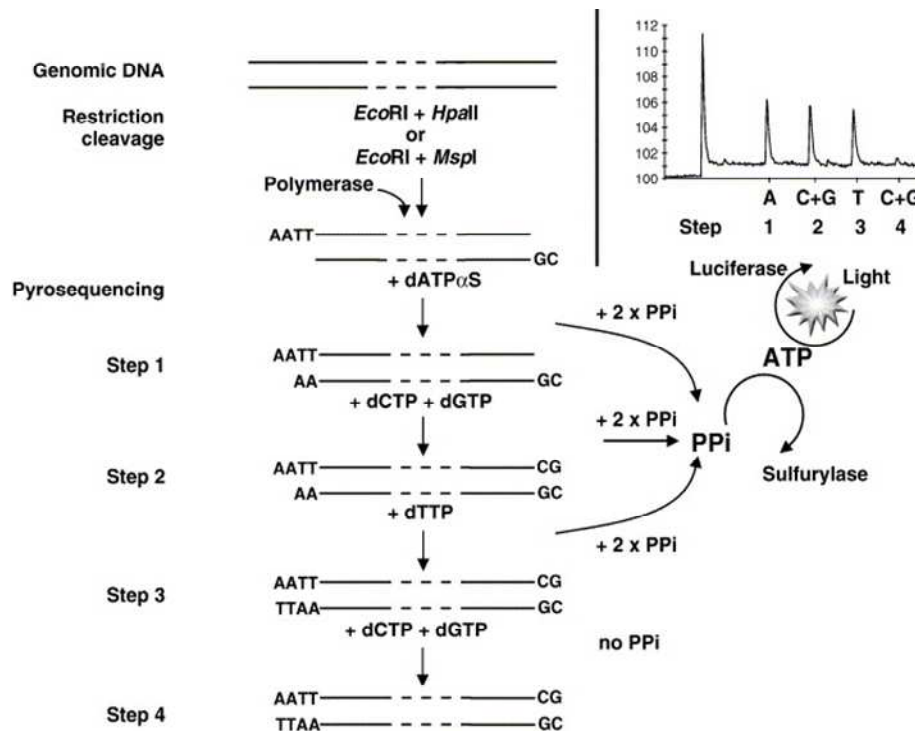


Abb. 2.7 Prinzip LUMA (Karimi 2006)

Chemikalien:

Enzyme:

MspI, HpaII, EcoRI

Fermentas, St. Leon-Rot, D

Tango Puffer

Fermentas, St. Leon-Rot, D

PyroGold SQA Reagent Kit

Biotage, Uppsala, S

Annealing Buffer (pH 7,6)

Biotage, Uppsala, S

20 mM Tris, 2 mM Mg-Acetat,

Material:

PyroMark ID (Pyrosequenzierer)

Biotage, Uppsala, S

PSQ 96 Platte

Biotage, Uppsala, S

Q-CpG Software

Biotage, Uppsala, S

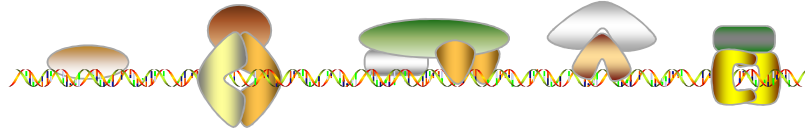
Heizblock

Biozym, Hessisch Oldendorf, D

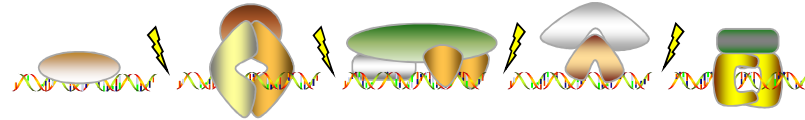
2.17 Chromatin-Immuno-Präzipitation (ChIP)

Mittels ChIP kann die Bindung bzw. Assoziation von Proteinen an DNA nachgewiesen werden. Dabei werden durch Formaldehyd DNA-Protein Interaktionen fixiert (*crosslinking*), die DNA durch Sonifikation fragmentiert und die DNA-Protein-Fragmente mittels Antikörper immunpräzipitiert. Nach Verdau mit Proteinase K und RNase A (*decrosslinking*) kann die DNA aufgereinigt und mittels quantitativer PCR analysiert werden (Abb. 2.8).

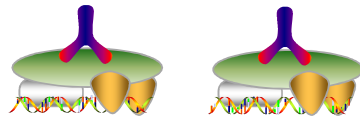
1. Fixierung der Protein-DNA Komplexe *in situ*



2. Kernisolation und Fragmentierung der DNA



3. Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen das Zielprotein und decrosslinking



4. Identifizierung der DNA-Sequenz mittels PCR

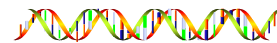


Abb. 2.8 Prinzip: Chromatin-Immuno-Präzipitation (<http://visiscience.com>; modifiziert)

Tag 1

Chromatin Isolierung

Für jede ChIP-Reaktion wurden ca. 5×10^6 T-Zellen eingesetzt. Zur Vernetzung von DNA mit ihr assoziierten Proteinen wurde eine Fixierung mit 1% Formaldehyd (10 min, RT) durchgeführt. Die Vernetzung wurde durch Glycinzugabe (Endkonzentration 0,125 M) abgestoppt und die Zellen für 5 min bei 300xg und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 1 mL PBS mit Proteinaseinhibitoren gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 mL Lyse-Puffer I aufgenommen und für 20 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde zentrifugiert (300xg, 10 min, 4°C) und der Überstand (enthielt lösliche Proteine des Zytoplasmas und ein Teil des Nukleoplasmas) verworfen. Das aus den Zellkernen bestehende Pellet wurde in 1 mL Lyse-Puffer II resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Im folgenden Schritt wurde das Chromatin durch Sonifikation fragmentiert (10 x 15 s, 40%). Um eine Erwärmung des Chromatins zu vermeiden wurde die Probe mit Eiswasser gekühlt und zwischen den einzelnen Ultraschallpulsen eine Pause von 45 s eingelegt. Das so fragmentierte Chromatin wurde anschließend über Nacht auf Eis gelagert.

Reversion einer Input-Probe

Von jeder Probe wurden 20 µL entnommen und mit je 1 µL Proteinase K und RNase A versetzt. Die Proben wurden dann für 1 h bei 37°C, 3 h bei 55°C und über Nacht bei 65°C inkubiert.

Blocken von Protein A+G Sepharose

Die benötigte Menge an A+G Sepharose berechnete sich folgendermaßen:

Für Preclearing: $20 \mu\text{L} \times \text{Immunpräzipitation (IP)} \times 2 \times \text{Anzahl Proben}$

Für ChIP: $30 \mu\text{L} \times \text{IP} \times \text{Anzahl Proben}$

Die so errechnete Menge an A+G Sepharose wurde in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt und zweimal mit 10 mL Lyse-Puffer II gewaschen. Dann wurde die A+G Sepharose in 5 mL Lyse-Puffer II aufgenommen und mit 1 mg/mL BSA und 400 $\mu\text{g/mL}$ Lachssperma-DNA versetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C im Überkopfschüttler zum Absättigen der A+G Sepharose.

Tag 2

Agarosegel des Input Chromatins

10 μL der revertierten Input-Probe wurden mit 2 μL Gel-Loading-Solution versetzt und auf ein 1,2%iges Agarosegel aufgetragen. Nach dem Gellauf erfolgte die Kontrolle der Fragmentierung mittels Gel-Dokumentations-Station. Das verwendete Chromatin besaß eine Fragmentgröße zwischen 200 bp und 1000 bp.

Preclearing I des Chromatins

Die abgesättigte A+G Sepharose wurde einmal mit Lyse-Puffer II gewaschen und der Überstand so weit abgenommen, bis eine Suspension mit 50% A+G Sepharose entstand. Zur jeder Chromatinprobe wurde A+G Sepharose (20 μL pro IP) zugegeben und der Ansatz für 2 h bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert.

Antikörper-Kopplung von A+G Sepharose

Pro IP wurden 20 μL A+G Sepharose in ein Reaktionsgefäß gegeben und 500 μL Lyse-Puffer II zugefügt. Es folgte die Zugabe von 1 μg Rabbit-IgG pro IP und eine Inkubation für 1 h bei 4°C auf dem Schüttler. Nach der Inkubation wurde die A+G Sepharose dreimal mit Lyse-Puffer II gewaschen und in das Preclearing II eingesetzt.

Preclearing II des Chromatins

Das Chromatin des Preclearings I wurde zentrifugiert (3000 rpm, 5 min) und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für das zweite Preclearing wurden pro IP 20 μL der mit IgG abgesättigten Sepharose hinzugefügt und der Ansatz für 2 h bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert.

Immunpräzipitation

Nach Beendigung des zweiten Preclearings wurde das Chromatin gleichmäßig auf Reaktionsgefäße verteilt. Gleichzeitig wurden drei Input Proben entsprechend 1% des IP Volumens entnommen. Den IPs wurden die gewünschten Antikörper (5 µL Anti-acetyl-H4 / 2,5 µL Anti-H3K27trimethyl) zugegeben und es folgte eine Inkubation bei 4°C über Nacht unter Rotation.

Tag 3

Immunpräzipitation

Jeder IP wurde 30 µL A+G Sepharose zugefügt und der Ansatz 2 h bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose bei 8000 rpm pelletiert und mit je

1 mL der folgenden Puffer gewaschen:	2 x Waschpuffer I
	2 x Waschpuffer II
	4 x Waschpuffer III
	2 x TE-Puffer pH8

Elution und Reversion

500 µL frischer Elutionspuffer wurde zur gewaschenen A+G Sepharose zugefügt und der Ansatz für 30 min bei RT auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Anschließend wurde die A+G Sepharose pelletiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 52 µL Reversionspuffer hinzugegeben. Die Input-Proben wurden ebenfalls mit Elutionspuffer und Reversionspuffer versetzt. Für alle Proben wurde die Reversion für 3 h bei 55°C und über Nacht bei 65°C durchgeführt.

Tag 4

Aufreinigung der DNA

Nach der Reversion wurde die immunpräzipitierte DNA mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits von Qiagen aufgereinigt. Jede Probe wurde mit 2,5 mL PB-Puffer versetzt, gut gemischt und auf die Säulen gegeben. Anschließend wurden die Säulen mit 500 µL PE-Puffer gewaschen und durch erneutes Zentrifugieren getrocknet. Zur Elution der ChIP-DNA wurden 50 µL EB-Puffer auf die Säule gegeben und die DNA nach 10minütiger Inkubation mittels Zentrifugation aus der Säule eluiert. Die Aufbewahrung der ChIP-DNA erfolgte bei -80°C.

PCR

Zur Auswertung der ChIP wurde eine quantitative PCR (s. 2.19) durchgeführt, wobei jeweils 1 µL Probe eingesetzt wurde.

Für die Berechnung des % Input der ChIP-Analyse gilt bei gleicher Verdünnung von Chromatin-Input und ChIP-DNA:

$$\Delta CT = CT_{\text{Input}} - CT_{\text{Probe}} \quad \Rightarrow \quad \% \text{ Input} = \frac{1}{2}^{\Delta CT}$$

Chemikalien:

Formaldehyd (37,5 %)	Roth, Karlsruhe, D
Glycin	Sigma, Taufkirchen, D
Proteinase K	Sigma, Taufkirchen, D
RNAse A	Invitrogen, Karlsruhe, D
BSA	Roth, Karlsruhe, D
Lachssperma DNA	Invitrogen, Karlsruhe, D
Protein A Sepharose	Invitrogen, Karlsruhe, D
Protein G Sepharose	Invitrogen, Karlsruhe, D
Antikörper:	
Rabbit IgG	Sigma, Taufkirchen, D
Anti-acetyl H4	Upstate, Temecula, USA
Anti-H3K29trimethyl	Abcam, Cambridge, UK
Lyse-Puffer I:	
5mM PIPES pH 8	Roth, Karlsruhe, D
85mM Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe, D
0,5% Igepal-CA630	Sigma, Taufkirchen, D
Protease-Inhibitor (complete™)	Roche, Mannheim, D
Lyse-Puffer II:	
10mM Tris-HCl pH 7,5	Roth, Karlsruhe, D
150mM Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, Taufkirchen, D
1% Igepal-CA630	Sigma, Taufkirchen, D
1% Natriumdeoxycholat (DOC)	Sigma, Taufkirchen, D
0,1% SDS	Roth, Karlsruhe, D
1mM EDTA	Roth, Karlsruhe, D
Protease-Inhibitor	Roche, Mannheim, D
Waschpuffer I:	
20mM Tris-HCl pH 8	Roth, Karlsruhe, D
150mM NaCl	Sigma, Taufkirchen, D
2mM EDTA	Roth, Karlsruhe, D
0,1% SDS	Roth, Karlsruhe, D
1% Triton X100	Sigma, Taufkirchen, D

Waschpuffer II:

20mM Tris-HCl pH 8	Roth, Karlsruhe, D
500mM NaCl	Sigma, Taufkirchen, D
2mM EDTA	Roth, Karlsruhe, D
0,1% SDS	Roth, Karlsruhe, D
1% Triton X100	Sigma, Taufkirchen, D

Waschpuffer III:

10mM Tris-HCl pH 8	Roth, Karlsruhe, D
1% Igepal-CA630	Sigma, Taufkirchen, D
1% DOC	Sigma, Taufkirchen, D
1mM EDTA	Roth, Karlsruhe, D
0,25M Lithiumchlorid (LiCl)	Sigma, Taufkirchen, D

1xTE-Puffer:

10mM Tris-HCl pH 8	Roth, Karlsruhe, D
1mM EDTA	Roth, Karlsruhe, D

Elutionspuffer:

1% SDS	Roth, Karlsruhe, D
0,1M NaHCO ₃	Merck, Darmstadt, D

Material:

Sonifier Cell Disruptor B15	Branson, Danbury, USA
Heizblock	Biozym, Hessisch Oldendorf, D
Überkopfschüttler	Kobe, Marburg, D

2.18 Nachweis von Genexpression auf mRNA-Ebene

2.18.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA aus Primärzellen erfolgte mit Hilfe des peqGOLD TriFast Reagenz von peqlab. Das Reagenz enthält Phenol und Guanidinisothiocyanat in einphasiger Lösung. Durch Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation trennt sich das Homogenat in drei Phasen auf. Die RNA ist in der wässrigen Phase enthalten, die DNA in der organischen und der Interphase und die Proteine befinden sich in der organischen Phase. Zur Durchführung erfolgte die Homogenisierung der Zellen durch Resuspension in TriFast (1mL pro 5×10^6 Zellen). Anschließend erfolgte eine Inkubation der Proben bei RT für 5 min, um die Dissoziation der Nukleotidkomplexe zu gewährleisten. Pro mL TriFast wurden dann 200 µL Chloroform zugegeben und der Ansatz für 15 s kräftig geschüttelt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 12.000xg, bei dem die Phasentrennung erfolgte. Die RNA war ausschließlich in der oberen wässrigen Phase angereichert, die vorsichtig abgenommen und in ein neues

Reaktionsgefäß überführt wurde. Es wurden 500 µL Isopropanol pro mL TriFast zur wässrigen Phase hinzugegeben, die Probe gemischt und für 5-15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 10 min bei 12.000xg und 4°C zentrifugiert, wobei sich die RNA als gelartiges Pellet abgesetzt hat. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet zweimal mit 1 mL 75% Ethanol gewaschen (10 min, 12.000xg, 4°C). Anschließend wurde das RNA-Pellet an der Luft getrocknet und in 25 µL RNase-freiem Wasser aufgenommen.

Chemikalien:

peqGOLD TriFast	peqlab, Erlangen, D
Chloroform	Sigma, Taufkirchen, D
Ethanol	Roth, Karlsruhe, D
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, D

Material:

Kühlzentrifuge BIOFUGE fresco	Heraeus, Osterode, D
-------------------------------	----------------------

2.18.2 DNase-Verdau

Zur Entfernung von kontaminierender DNA aus der RNA-Präparation wurde ein Verdau mit DNase I durchgeführt. Hierzu wurde der Desoxyribonuclease I Amplifikation Grade Kit von Invitrogen verwendet. Die komplette RNA-Präparation (25 µL) wurde mit 1,4 µL DNase I und 2,5 µL 10x Reaktionspuffer versetzt und 15 Minuten bei RT inkubiert. Durch anschließende Zugabe von 2,5 µL 25 mM EDTA und eine zehnminütige Inkubation bei 65°C wurde die enzymatische Aktivität der DNase inaktiviert. Die nun DNA-freie RNA konnte bei -80°C gelagert werden.

Chemikalien:

Desoxyribonuclease I, Amplifikation Grade	Invitrogen, Karlsruhe, D
---	--------------------------

Material:

Heizblock	Biozym, Hessisch Oldendorf, D
-----------	-------------------------------

2.18.3 RNA-Quantifizierung

Die Bestimmung der RNA-Konzentration einer Probe erfolgte mittels Photometer.

Die RNA-Probe wurde mit RNase-freiem-Wasser 1:50 verdünnt und anschließend der RNA-Gehalt über die Absorption bei 260 nm ermittelt. Durch Ermittlung des Quotienten

260 nm / 280 nm konnte weiterhin eine Aussage über die Qualität der RNA-Präparation erhalten werden. Bei guten Präparationen liegt dieser Wert im Bereich von 1,8 – 2,0.

Material:

Ultraspec 3100pro UV/Visible Spectrophotometer

Biochrom, Cambridge, UK

2.18.4 Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription dient die aufgereinigte mRNA als Matrize für die Synthese von cDNA mittels des Enzyms Reverse Transkriptase. Hierzu wurden 0,5 µg der RNA mit 2 µL 10x RT-Puffer, 2 µL dNTP-Mix (Endkonzentration: 0,5 mM je dNTP), 1 µL Oligo-dT 18 Primer (Endkonzentration 1 µM) und 1 µL der Omniscript Reversen Transkriptase versetzt und der Ansatz auf 20 µL mit RNase-freiem-Wasser aufgefüllt. Danach erfolgte eine Inkubation für 1 Stunde bei 37°C und anschließend 5 Minuten bei 93°C. Die auf diese Weise erhaltene cDNA wurde 1:4 mit RNase-freiem-Wasser verdünnt und konnte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert werden.

Chemikalien:

Omniscript® Reverse Transcription Kit

Qiagen, Hilden, D

Oligo-dT 18 Primer

Metabion, Martinsried, D

Material:

Biometra TRIO-Thermoblock

Biometra, Göttingen, D

2.19 Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion (qPCR)

Die PCR ist eine Methode zur Amplifikation beliebiger DNA-Abschnitte, wobei bei der quantitativen PCR deren Anstieg über die Zeit beobachtet werden kann.

Bei dem hier verwendeten System wurde die PCR mit einem Gerät durchgeführt, das aus einer Kombination von PCR-Gerät mit Fluoreszenzdetektion besteht (RotorGene™3000 von Corbett). Zur Durchführung wurde der QuantiTect™Sybr®Green-Kit von Qiagen verwendet. Dieser enthält einen MasterMix aus TaqPolymerase, dNTPs, PCR-Puffer und dem Fluoreszenzfarbstoff SybrGreenI. SybrGreenI interkaliert in doppelsträngige DNA und ist dann fluoreszierend, was bedeutet, dass die Fluoreszenzintensität mit der Zunahme von PCR-Produkten steigt. Da das PCR-Gerät nach jeder Elongationsphase die Fluoreszenzintensität misst, kann die Zunahme der PCR-Produkte über die Zeit verfolgt werden. Nach 45 Zyklen erfolgt dann eine Schmelzkurvenanalyse, bei der die Temperatur

in Intervallen von 0,1°C erhöht und die Fluoreszenz kontinuierlich gemessen wird. Da jede doppelsträngige DNA eine spezifische Schmelztemperatur besitzt, die definiert ist als die Temperatur bei der 50% der DNA einzelsträngig vorliegen, kann man aus dem Verlauf der Schmelzkurve erkennen, ob neben dem jeweils spezifischen PCR-Produkt auch Nebenprodukte entstanden sind.

Der PCR-Ansatz für die quantitative PCR wurde folgendermaßen hergestellt:

Es wurde ein MasterMix erzeugt, der pro Ansatz 5 µL SybrGreenI, 0,25 µL sense-Primer (50 pmol/µL), 0,25 µL antisense-Primer (50 pmol/µL) und 2,5 µL Wasser enthielt. Mit Hilfe eines Pipettier-Roboters wurden dann 8 µL MasterMix und 2 µL cDNA aus der Reversen Transkription in ein 0,1 mL Reaktionsgefäß pipettiert und dieses in das Gerät gestellt.

Programm für den RotorGene™3000:

Aktivierungsschritt	15 Minuten	95°C	45 Zyklen
Denaturierung	15 Sekunden	94°C	
Annealing	30 Sekunden	52°C	
Extension	15 Sekunden	72°C	
Temperaturgradient		65°C - 95°C	

Um quantitative Unterschiede feststellen zu können, wurde zunächst eine PCR mit einem Haushaltsgen (Gapdh oder CD3d) durchgeführt, welches konstitutiv exprimiert wird. Daraufhin erfolgte eine PCR mit den Primern des zu analysierenden Gens (s. 2.20). Die so erhaltenen Werte werden mit denen des Haushaltsgens abgeglichen ($2^{-\Delta\Delta CT}$), so dass man Rückschlüsse auf die Expression des gesuchten Gens erhält.

Chemikalien:

QuantiTect™Sybr®Green PCR Master Mix	Qiagen, Hilden, D
Primer	Metabion, Martinsried, D

Material:

RotorGene™3000	Corbett, Sydney, AUS
0,1 mL Strip-Tubes	Corbett, Sydney, AUS
CAS-1200™ (Pipettier-Roboter)	Corbett, Sydney, AUS

2.20 Primer

Tab. 2.3 qPCR-Primer

Gen	Sense-Primer (5' - 3')	Antisense-Primer (5' - 3')	Annealing-temperatur	Produkt-größe
Gapdh	AAC TTT GGC ATT GTA CG	GGA TGC AGG GAT GAT GTT	52°C	132 bp
CD3d	ACA CTC AAC TTG GGC AAA GG	CAG AGT TGC GAT GAG GTC AA	52°C	180 bp
IFN γ	GCG TCA TTG AAT CAC ACC TG	TGA GCT CAT TGA ATG CTT GG	52°C	129 bp
IL-4	TCA ACC CCC AGC TAG TTG TC	TGT TCT TCG TTG CTG TGA GG	52°C	177 bp
IL-5	AGC ACA GTG GTG AAA GAG ACC T	TCC AAT GCA TAG CTG GTG ATT T	52°C	117 bp
IL-13	CCA TCC CAT CCC TAC AGA AA	ATA GGC AGC AAA CCA TGT CC	52°C	181 bp

Tab. 2.4 Bisulfit-PCR-Primer

Gen	Sense-Primer (5' - 3')	Antisense-Primer (5'-Biotin - 3')	Annealing-temperatur	Produkt-größe
IFN γ	GGT TTG AGA AGT TTA AGA GTT TTT TTA	CCT ACA CCT CTC TAA CTT CCA ATT TTA TAC CTA ATC	60°C	335 bp
CNS1	TAT AAG GGT TGT AGG AAG AGT AAT GTA GTT TTT ATA T	CAC TTT AAA CTA ATC AAA CCT AAA ACT ATA TCC ATA	52°C	474 bp
IL-4	GTT AAA GTT TTA TTT TAT GGT TTT GTT TGT TTT AT	ACA AAT AAA TTT TCC TAT AAA ATC AAA CCA ATT AA	52°C	456 bp
IL-5	GGG GAT AAA AAA GAA GGT GTT TAA GAA AAG T	AAA CAC TCA AAT ACA AAA ACA TCC TTC TCA TAA CT	52°C	453 bp

Tab. 2.5 Pyrosequenzier-Primer

Gen	Sequenzierprimer 1 (5' - 3')	Sequenzierprimer 2 (5' - 3')	Sequenzierprimer 3 (5' - 3')
IFN γ	ATT TTA TAA GAA TGG TAT AGG TG	AAA ATT AAA AAA AAA TTT GTG	-
CNS1	AAT GTA GTT TTT ATA TAT TGG TTT AT	TTG AGA GGG GAT TAT TTT TTA T	TAT GGG GTT TTT TTT GGT TG
IL-4	TTT TTT TGA TAT TAT TTT GTT	-	-
IL-5	AAG AAG GTG TTT AAG AAA AG	TTT TTT AGA GAG AGA ATA AAT TG	-

Tab. 2.6 ChIP-Primer

Gen	Sense-Primer (5' - 3')	Antisense-Primer (5' - 3')	Annealing-temperatur	Produkt-größe
IFN γ	CAT ACC CTT TCC TTG CTT TTC	TTG TGG GAT TCT CTG AAA GCA	52°C	277 bp
CNS1	GGG AGT TTC TTA GGC CCT CT	CCC CCT CTC ACT GTG AAA AC	58°C	274 bp
IL-4	TCT GCC TCC ATC ATC CTT CT	ACA CCA TAA TCG GCC TTT CA	58°C	256 bp
IL-5	ACC CTG AGT TTC AGG ACT CG	TCC CCA AGC AAT TTA TTC TCT C	52°C	94 bp

2.21 Statistische Auswertung

Für die graphische Auswertung der Analysen-Daten sowie für die statistische Auswertung und die Berechnung der Signifikanz wurde die Software GraphPad Prism[®] eingesetzt. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben. Zur Überprüfung der Vergleichsgruppen auf statistische Signifikanz wurden „One-Way ANOVA“ bzw. der „Student's t-Test“ verwendet. Signifikante Unterschiede sind gekennzeichnet bei: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3 ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob Umwelteinflüsse in Form bakterieller Stimuli auf weibliche Mäuse zu einer Beeinflussung epigenetischer Regulationsmechanismen (DNA-Methylierung und Histonmodifizierung) in deren Nachkommen führen, die bei der Entstehung eines reduzierten asthmatischen Phänotyps in diesen Nachkommen eine Rolle spielen könnten. Als „Proof-of-Concept“ wurde dazu zunächst mittels des DNA-Methyltransferase-Inhibitors 5-Aza-2'-Deoxycytidin untersucht, ob DNA-Methylierung sowohl generell, als auch T-Zell-spezifisch bei der Entstehung des asthmatischen Phänotyps im Mausmodell des experimentellen Asthmas eine Rolle spielt. Das dies für Histonmodifikationen der Fall ist, wurde von Choi und Kollegen mit Hilfe des Histondeacetylase-Inhibitors Trichostatin A bereits gezeigt (Choi 2005). Anschließend wurde dann im pränatalen Mausmodell des experimentellen Asthmas untersucht, ob die Exposition von Muttertieren mit dem Modellkeim *A. lwoffii* F78 zu einer Veränderung des DNA-Methylierungsgrades und/oder von Histonmodifikationen (H4ac und H3K27me3) Th1/Th2-relevanter Gene in CD4⁺-T-Zellen der Nachkommen führt. Desweiteren wurde mittels eines HAT-Inhibitors analysiert, ob diese Veränderungen zum reduzierten asthmatischen Phänotyp nach pränataler bakterieller Exposition beitragen.

3.1 Einfluss von DNA-Methylierung auf den asthmatischen Phänotyp im Tiermodell der akuten Atemwegsentzündung

Unter Verwendung des DNA-Methyltransferase-Inhibitors 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5Aza) sollte initial untersucht werden, ob eine veränderte epigenetische Ausgangssituation in Bezug auf DNA-Methylierung die Etablierung eines asthmatischen Phänotyps im Mausmodell beeinflussen kann.

3.1.1 Zytotoxizität von 5-Aza-2'-Deoxycytidin - Dosisfindung

In seiner Eigenschaft als DNA-Methyltransferase-Inhibitor könnte das Reagenz 5Aza in den Zellzyklus eingreifen und somit zytostatische bzw. zytotoxische Wirkung auf Zellen ausüben. Daher war es wichtig, Tiere mit einer Dosis zu behandeln, die zwar einen Effekt auf den DNA-Methylierungsstatus aufweist, aber keine zytotoxischen und

antiproliferativen Auswirkungen zeigt. Dazu wurden, ausgehend von Langzeitbehandlungs-Modellen aus der Tumorforschung (Lantry 1999), drei verschiedene Dosen (1 mg/kg, 0,5 mg/kg und 0,2 mg/kg Körpergewicht) zunächst auf ihre zytotoxischen Eigenschaften hin untersucht. Zur Durchführung wurden dafür Balb/c-Mäuse dreimal pro Woche über zwei Wochen mit der entsprechenden Dosis i.p. behandelt und anschließend erfolgte die Analyse der Tiere. Die Dosis von 1 mg/kg erwies sich hier als letale Dosis bei dauerhafter 5Aza-Behandlung. Bezüglich des äußerlichen Zustandes der mit 0,5 mg/kg und 0,2 mg/kg behandelten Tiere wies die 0,5 mg/kg Gruppe leichte Fellveränderungen auf, aber keine der beiden Behandlungsgruppen zeigte Gewichtsverluste. Weiterhin wurde ein Blutaussstrich zur Differenzierung des Blutbildes hergestellt, bei dem sich zeigte, dass die Dosis 0,5 mg/kg zu einer rapiden Abnahme der Gesamt-Leukozytenzahl im Blut führte im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe. Dies war im Wesentlichen bedingt durch die Abnahme an neutrophilen Granulozyten. Die Tiere, die mit 0,2 mg/kg behandelt worden sind, zeigten bezüglich des Blutbildes keinen Unterschied zur PBS-Kontrollgruppe (Abb. 3.1).

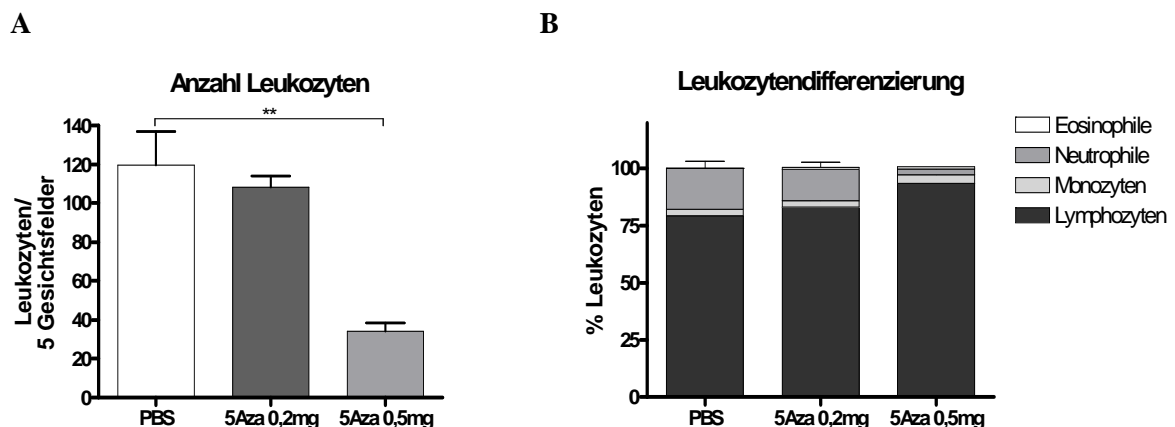


Abb. 3.1 Zytotoxizität und Dosisfindung für 5Aza

Balb/c-Mäuse (n = 6 pro Gruppe) wurden für zwei Wochen dreimal pro Woche mit verschiedenen Dosen 5Aza i.p. behandelt. Anschließend erfolgte eine Blutabnahme zur Herstellung von Blutaussstrichen. (A) Anzahl an Leukozyten innerhalb von fünf Gesichtsfeldern. (B) Leukozytendifferenzierung von May-Grünwald-Giemsa-gefärbten Blutaussstrichen.

Für die Dosis 0,2 mg/kg wurde zusätzlich untersucht, inwiefern sie Auswirkungen auf die Proliferation von MNCs, und im speziellen auf CD4⁺-T-Zellen aus der Milz hat (Abb. 3.2). Dazu wurden MNCs aus der Milz isoliert und ein Proliferationsassay mittels CFSE durchgeführt. Die CD4⁺-T-Zellen wurden zusätzlich mit Hilfe eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers markiert und eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Hier zeigte sich, dass die Behandlung von Balb/c-Mäusen mit einer Dosis von 0,2 mg/kg über einen

längeren Zeitraum die Proliferationsfähigkeit von MNCs und CD4⁺-T-Zellen nicht beeinflusst (Abb. 3.2).

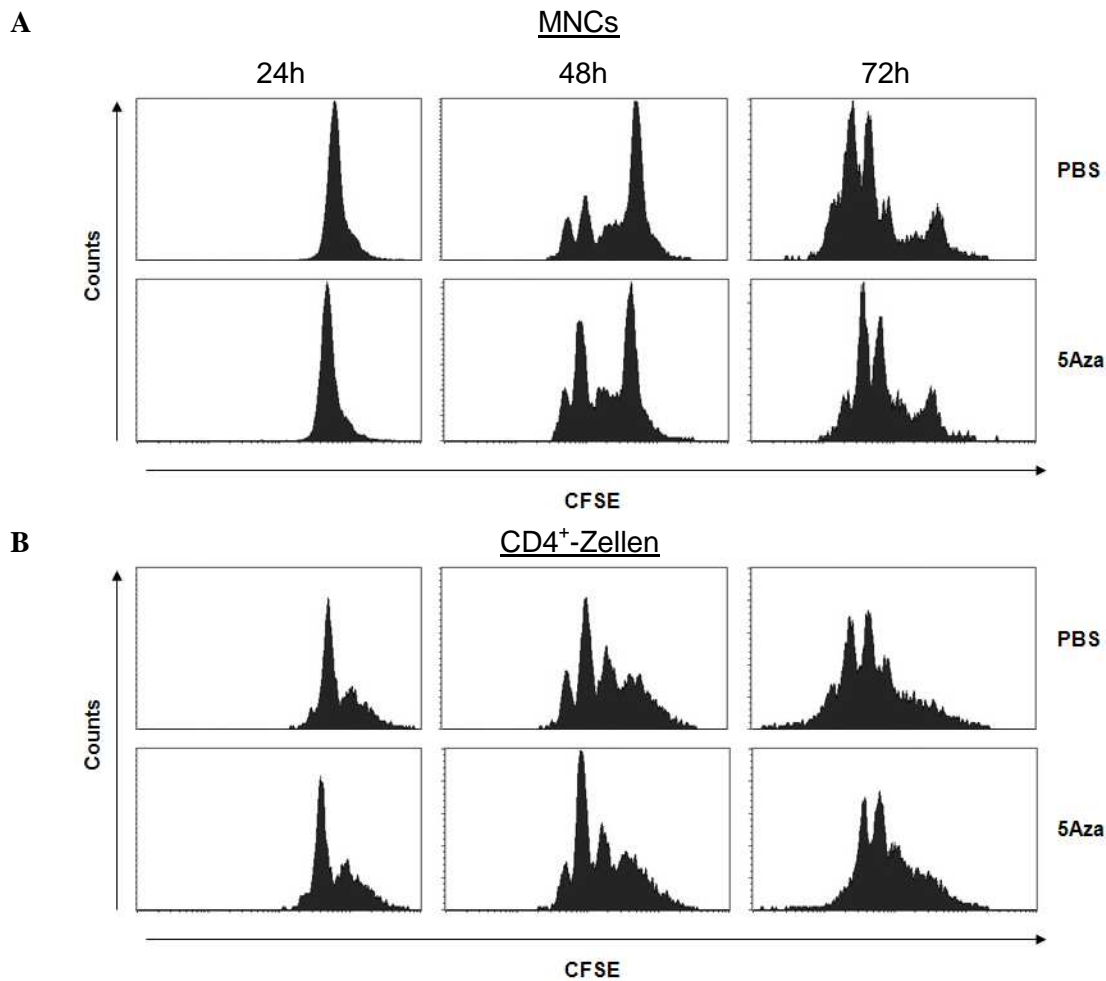


Abb. 3.2 Keine Beeinflussung der Proliferationsfähigkeit von Immunzellen nach 5Aza-Behandlung *ex vivo*

Balb/c-Mäuse (n = 4 pro Gruppe) wurden für zwei Wochen dreimal pro Woche mit 0,2 mg/kg 5Aza i.p. behandelt. Anschließend wurden MNCs aus der Milz isoliert, mit CFSE markiert und mit anti-CD3/anti-CD28 stimuliert. Nach 24h, 48h und 72h erfolgte die Bestimmung der Proliferationsfähigkeit mittels FACS sowohl von (A) MNCs als auch (B) CD4⁺-T-Zellen.

Um vollständig ausschließen zu können, dass die 5Aza-Behandlung *in vivo* zur Beeinflussung der Proliferation von Immunzellen führt, wurden weiterhin CFSE-markierte CD4⁺-T-Zellen in SCID-Mäuse transferiert, die jeden zweiten Tag mit der entsprechenden Dosis 5Aza behandelt wurden. Da diese Tiere T-Zell-defizient sind, ist dies ein Anreiz für die transferierten Zellen zu Proliferieren (Li 2007). Acht Tage nach dem Transfer erfolgte die Isolation von MNCs aus der Milz und die Bestimmung der Proliferationsfähigkeit der transferierten Zellen mittels FACS, wobei die CD4⁺-T-Zellen zusätzlichen mittels eines APC-gekoppelten anti-CD4-Antikörpers markiert wurden. Hier zeigte sich, dass auch in der *in vivo* Situation die 5Aza-Behandlung in der verwendeten Dosis keinerlei

zytostatischen Einfluss auf die T-Zellen hatte (Abb. 3.3). Es kam sowohl in den PBS-behandelten, als auch in den 5Aza-behandelten Mäusen zur gleichen Anzahl von Zellteilungen.

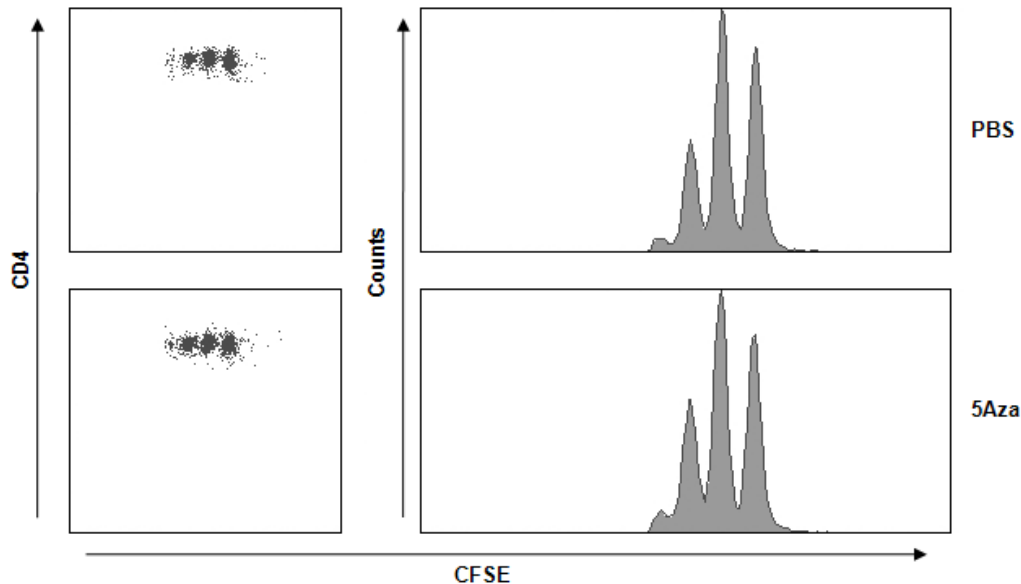


Abb. 3.3 Keine Beeinflussung der Proliferationsfähigkeit von Immunzellen nach 5Aza-Behandlung *in vivo*

CFSE markierte CD4⁺-T-Zellen wurden SCID-Mäusen transferiert und die Mäuse anschließend alle zwei Tage mit 0,2 mg/kg 5Aza i.p. behandelt. Nach acht Tagen wurde die Proliferationsfähigkeit der transferierten Zellen mittels FACS bestimmt.

3.1.2 Inhibition der DNA-Methylierung durch 5-Aza-2'-Deoxycytidin

Neben dem Ausschluss zytotoxischer Eigenschaften war es ferner von Bedeutung, dass die ausgewählte 5Aza-Dosis tatsächlich auch den DNA-Methylierungsstatus beeinflusst. Dazu wurden weibliche Balb/c-Tiere wiederum dreimal pro Woche mit 5Aza behandelt, wobei hier die Dosis von 0,2 mg/kg Anwendung fand. Die Analyse erfolgte nach einer bzw. drei Wochen, indem den Tieren zunächst Blut aus der Schwanzvene entnommen wurde. Aus den Leukozyten des Blutes wurde die DNA isoliert und eine Analyse des genomweiten Methylierungsgrades mittels LUMA durchgeführt (Abb. 3.4). Hier zeigte sich, dass sowohl nach einer Woche, als auch nach drei Wochen 5Aza-Behandlung die Dosis von 0,2 mg/kg zu einer DNA-Demethylierung im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe führt. Gleichzeitig wurde hiermit gezeigt, dass die DNA-Demethylierung auch über einen längeren Zeitraum hinweg aufrechterhalten werden kann. Daher wurde für die folgenden Versuche eine Dosis von 0,2 mg/kg zur Behandlung verwendet, da hier keine zytotoxischen bzw. antiproliferativen Auswirkungen vorhanden waren.

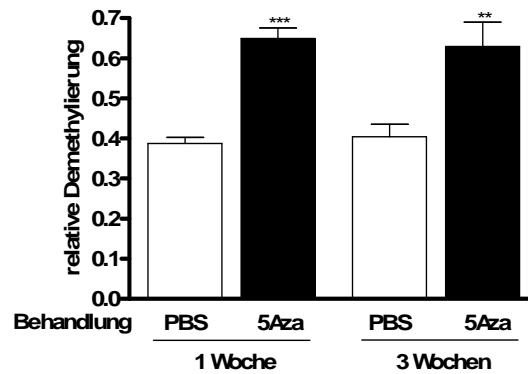


Abb. 3.4 Genomweite Demethylierung nach 5Aza-Behandlung

Balb/c-Mäuse wurden drei Wochen lang dreimal pro Woche mit 0,2 mg/kg 5Aza i.p. behandelt. Nach einer und drei Wochen wurde den Tieren Blut abgenommen und daraus die Leukozyten isoliert. Aus den Leukozyten erfolgte die Aufreinigung der DNA und der DNA-Demethylierungsgrad wurde mittels LUMA bestimmt.

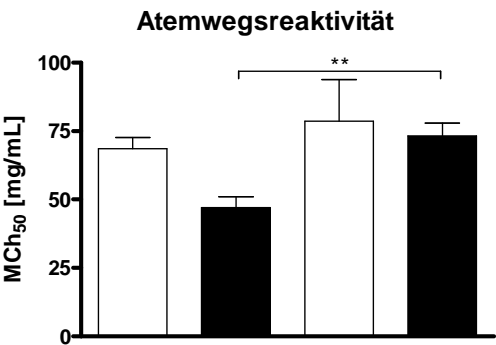
3.1.3 Pharmakologische DNA-Demethylierung durch 5Aza führt zu einer Prävention des asthmatischen Phänotyps im Mausmodell des experimentellen Asthmas

Um zu untersuchen, ob ein unterschiedlicher DNA-Methylierungsgrad die Ausprägung des asthmatischen Phänotyps im Mausmodell der akuten Atemwegsentzündung beeinflusst, wurden Balb/c-Mäuse beginnend zwei Wochen vor der ersten Sensibilisierung bis zur ersten OVA-Aerosol-Provokation 3mal pro Woche mit einer 5Aza-Dosis von 0,2mg/kg Körpergewicht intraperitoneal behandelt (Abb. 2.2).

Nach dreimaliger OVA-Aerosol-Provokation erfolgte die Analyse der Tiere, mittels der im Methodenteil beschriebenen Analysen, wobei sich folgendes Bild zeigte (Abb. 3.5): Nach OVA-Sensibilisierung und -Provokation entwickelten die Tiere eine Atemwegshyperreaktivität gegenüber Methacholin, was sich in einer signifikanten Verringerung der Lungenfunktion darstellte (Abb. 3.5A). Weiterhin zeigte sich eine starke Entzündung der Atemwege, hauptsächlich bedingt durch den Einstrom eosinophiler Granulozyten und Lymphozyten in die Lunge (Abb. 3.5B). Auch bei der histologischen Analyse des Atemwege und des Lungengewebes zeigte sich eine Infiltration von inflammatorischen Zellen zusammen mit einer Metaplasie und erhöhter Mukusproduktion der Becherzellen (Abb. 3.6). Die Behandlung der Tiere mit 5Aza parallel zur OVA-Sensibilisierung führte zu einer nahezu kompletten Aufhebung des asthmatischen Phänotyps, angefangen bei einer deutlich verbesserten Lungenfunktion nach Methacholin-Provokation, die mit der PBS-schein-sensibilisierten Kontrollgruppe vergleichbar war (Abb. 3.5A).

Weiterhin zeigte sich eine deutliche Verringerung der Anzahl der Leukozyten in der BAL. Die weitere Differenzierung der Leukozyten zeigte, dass diese Reduktion bedingt war durch eine deutlich verringerte Anzahl an eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten, trotz eines geringen Anstiegs von Makrophagen (Abb. 3.5B).

A



B

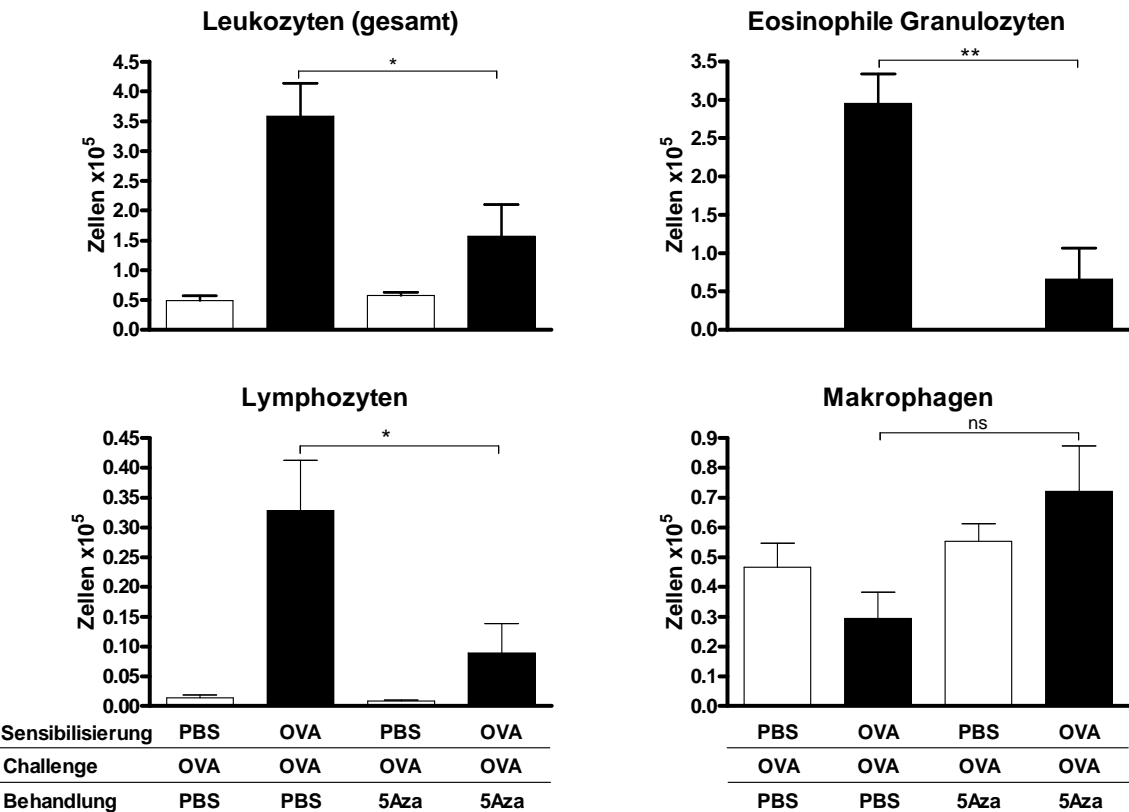


Abb. 3.5 5-Aza-2'-Deoxycytidinbehandlung verhindert die Ausbildung des asthmatischen Phänotyps im Tiermodell des experimentellen Asthmas

Balb/c-Mäuse (n = 6 pro Gruppe) wurden beginnend zwei Wochen vor Sensibilisierung dreimal pro Woche mit 0,2 mg/kg 5Aza i.p. behandelt. Anschließend erfolgte eine Provokation mit 1% OVA-Aerosol an drei aufeinander folgenden Tagen. (A) 24h nach der letzten OVA-Provokation erfolgte die Analyse der Atemwegsreaktivität mittels Head-Out-Body-Plethysmographie. (B). Differenzierung der Leukozyten in der BAL-Flüssigkeit.

Auch nach histologischer Untersuchung des Lungengewebes mittels PAS-Färbung konnte festgestellt werden, dass die 5Aza behandelten Tiere bezüglich Akkumulation inflammatorischer Zellen und dem Vorhandensein von mukusproduzierenden Becherzellen den PBS-Kontrolltieren glichen und kaum Anzeichen einer Atemwegsentzündung aufwiesen (Abb. 3.6).

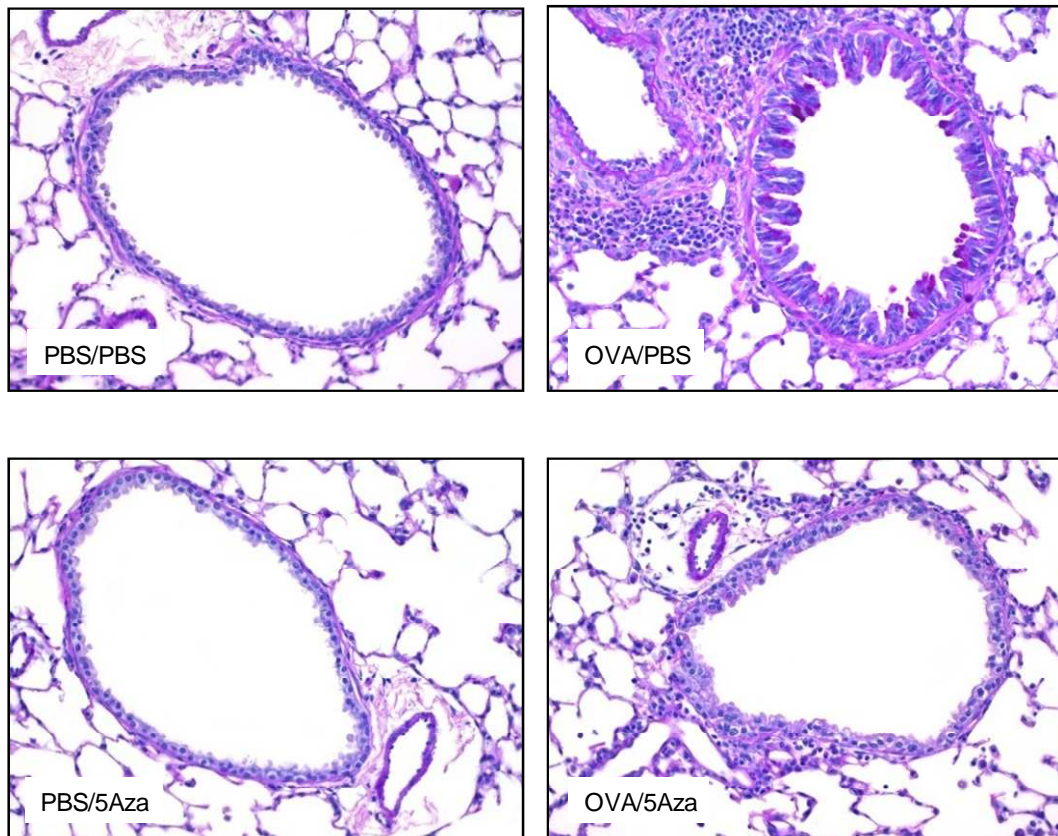


Abb. 3.6 5-Aza-2'-Deoxycytidinbehandlung verhindert inflammatorische Reaktion im Lungengewebe

Balb/c-Mäuse (n = 6 pro Gruppe) wurden beginnend zwei Wochen vor Sensibilisierung dreimal pro Woche mit 0,2 mg/kg 5Aza i.p. behandelt. Anschließend erfolgte eine Provokation mit 1% OVA-Aerosol an drei aufeinander folgenden Tagen. Histologische Darstellung der Infiltration inflammatorischer Zellen in das Lungengewebe, sowie des Anteils mukusproduzierender Becherzellen (lila) in den Atemwegen mittels PAS-Färbung.

Die Verhinderung des asthmatischen Phänotyps ging einher mit einer Verschiebung des Zytokinprofils in die Th1-Richtung, da mit anti-CD3/anti-CD28 stimulierte MNCs der Lungenlymphknoten einen deutlichen Anstieg in der IFN γ -Produktion zeigten, mit gleichzeitiger stark verringerter Produktion der Th2-Zytoine IL-4, IL-5 und IL-13 (Abb. 3.7). Das gleiche Zytokinmuster zeigte sich auf Proteinebene auch nach Stimulation von

MNCs aus der Milz (Abb. 3.8B), was sich mit Ausnahme von IL-4 auf mRNA-Ebene bestätigte (Abb. 3.8A).

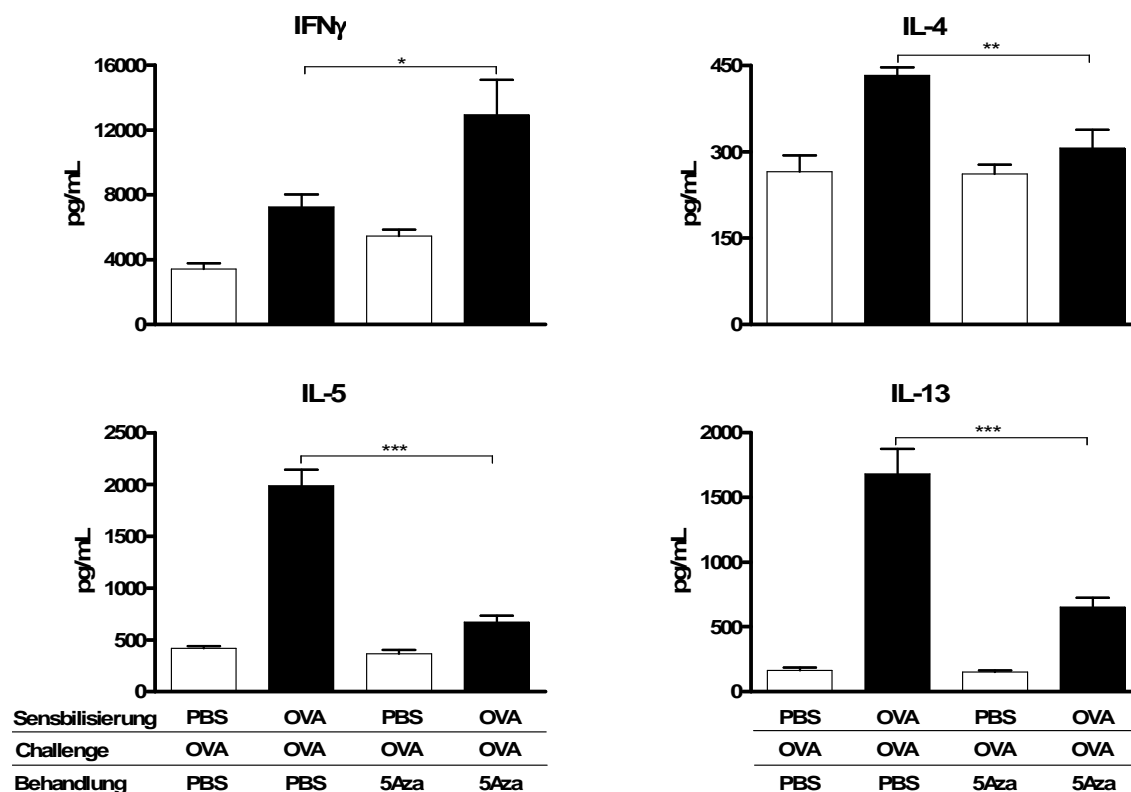


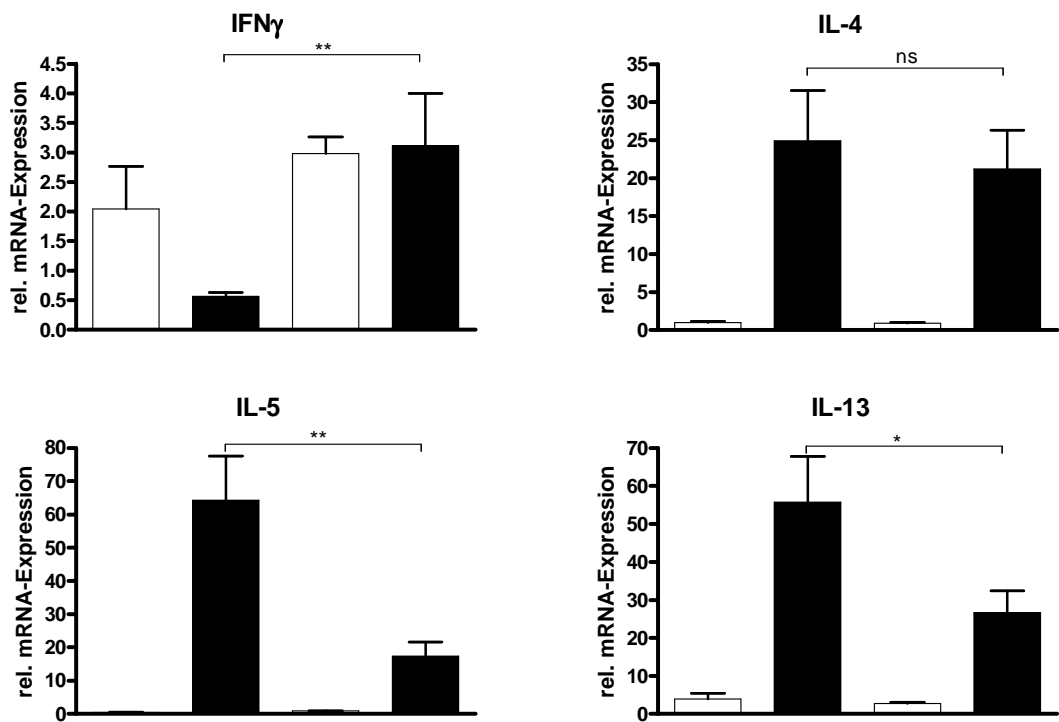
Abb. 3.7 5-Aza-2'-Deoxycytidinbehandlung führt zu einer Veränderung der Th1/Th2-Balance in MNCs aus den LK der Lunge

Balb/c-Mäuse (n = 6 pro Gruppe) wurden beginnend zwei Wochen vor Sensibilisierung dreimal pro Woche mit 0,2 mg/kg 5Aza i.p. behandelt. Nach anschließender Provokation mit 1% OVA-Aerosol an drei aufeinander folgenden Tagen wurden MNCs aus den lungendrainierenden LK isoliert und für 24h mit anti-CD3/anti-CD28 stimuliert. Anschließend wurde die Zytokin-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt.

Die Veränderung der Zytokinproduktion korrelierte mit dem Vorhandensein der verschiedenen OVA-spezifischen Immunglobuline im Serum. So zeigten 5Aza-behandelte Tiere eine geringere Produktion von Gesamt-IgE, sowie von OVA-spezifischem-IgE und -IgG1, und im Gegenzug einem Anstieg von OVA-spezifischem-IgG2a im Vergleich zur OVA-Kontrollgruppe (Abb. 3.9).

Die alleinige 5Aza-Behandlung ohne OVA-Sensibilisierung als Kontrolle zeigte keinerlei Einfluss, sowohl auf Parameter des asthmatischen Phänotyps, als auch auf die Zytokin- und Antikörper-Produktion und war vergleichbar der PBS-Kontrollgruppe.

A



B

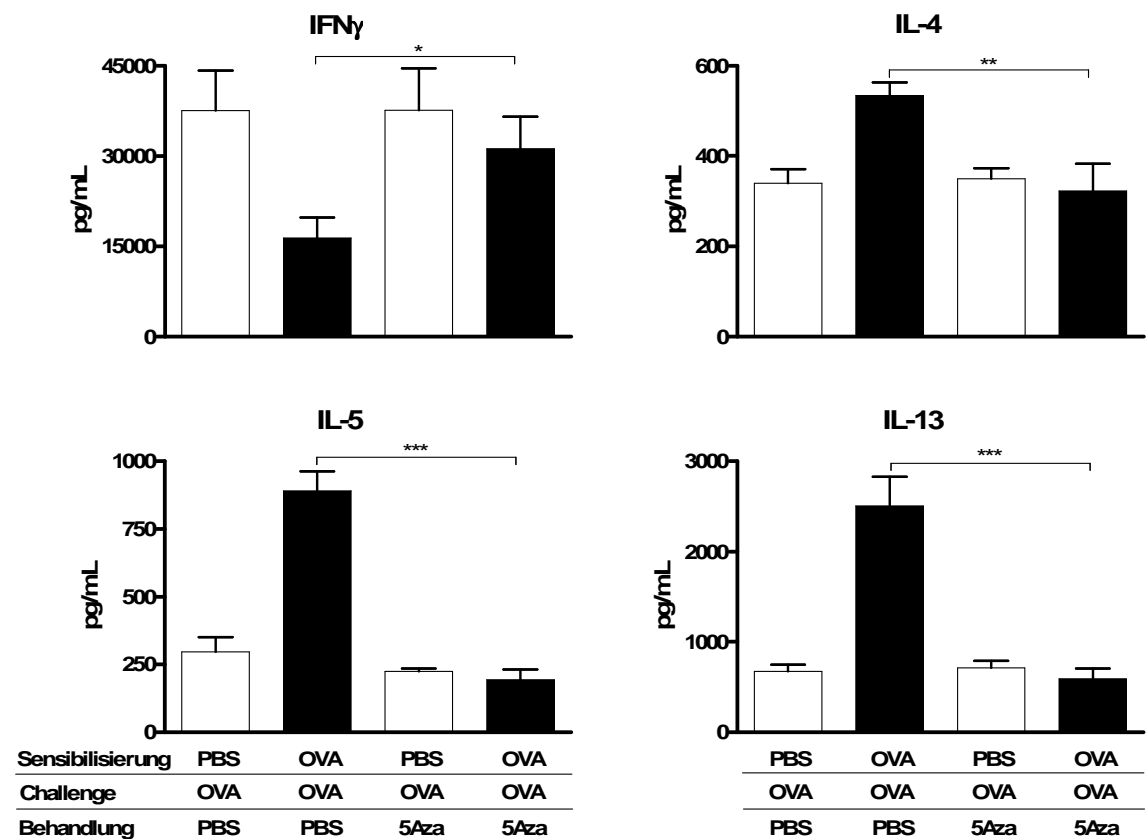


Abb. 3.8 5-Aza-2'-Deoxycytidinbehandlung führt zu einer Veränderung der Th1/Th2-Balance in MNCs aus der Milz

Balb/c-Mäuse (n = 6 pro Gruppe) wurden beginnend zwei Wochen vor Sensibilisierung dreimal pro Woche mit 0,2 mg/kg 5Aza i.p. behandelt. Nach anschließender Provokation mit 1% OVA-Aerosol an drei aufeinander folgenden Tagen wurden MNCs aus der Milz isoliert und für 24h mit anti-CD3/anti-CD28 stimuliert. Aus den MNCs wurde anschließend die (A) relative mRNA-Expression der Zytokine analysiert, sowie die (B) Zytokine im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt.

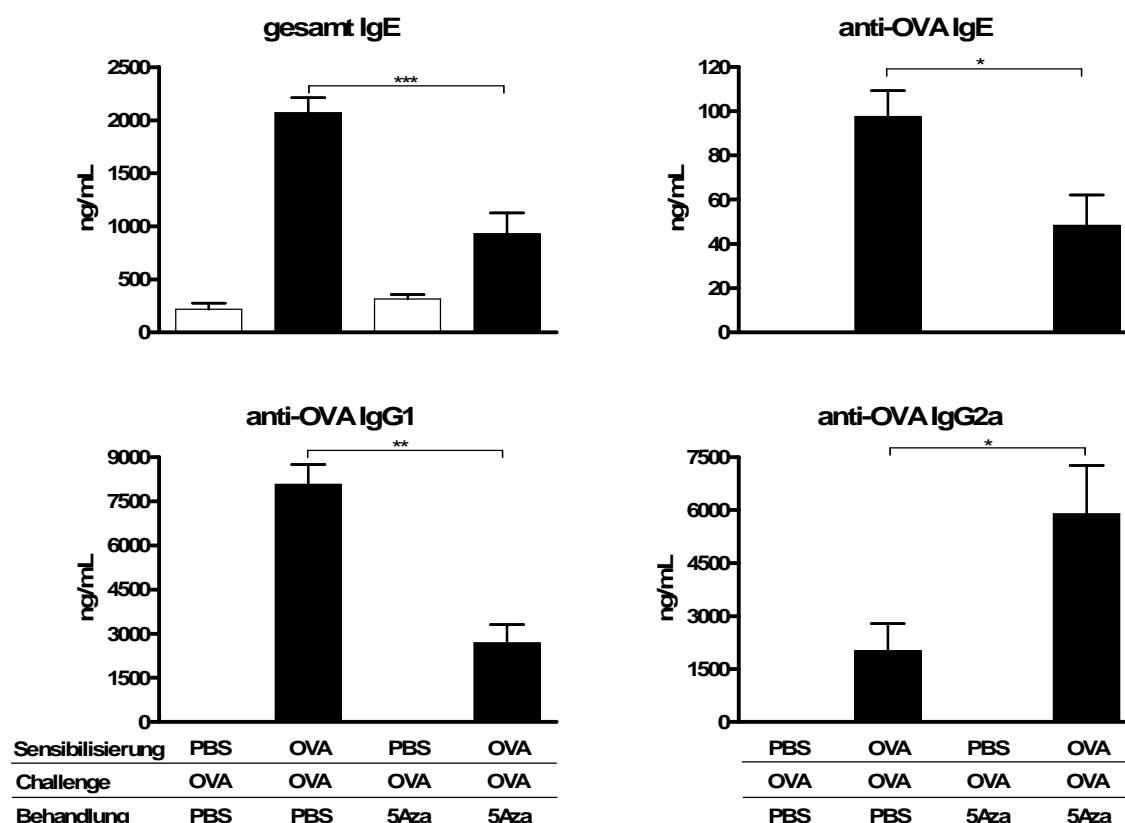


Abb. 3.9 5-Aza-2'-Deoxycytidinbehandlung führt zu einem erhöhten Anteil OVA-spezifischer IgG2a-Antikörper, sowie zu einer Erniedrigung Th2-induzierter IgE- und IgG1-Antikörper

Balb/c-Mäuse (n = 6 pro Gruppe) wurden beginnend zwei Wochen vor Sensibilisierung dreimal pro Woche mit 0,2 mg/kg 5Aza i.p. behandelt. Nach anschließender Provokation mit 1% OVA-Aerosol an drei aufeinander folgenden Tagen wurde den Tieren Blut abgenommen und der Anteil an gesamt IgE und anti-OVA-IgE, -IgG1 und -IgG2a im Serum mittels ELISA bestimmt.

3.1.3.1 DNA-Methylierung Th1- und Th2-spezifischer Genregionen ist nach 5Aza-Behandlung unterschiedlich stark beeinflusst

Da der protektive Einfluss von 5Aza mit einer geänderten Balance des Th1/Th2 Zytokinprofils einherging, wurde zusätzlich zur Analyse der genomweiten Methylierung mittels LUMA eine Th1/Th2-genspezifische Analyse des Methylierungsgrades durchgeführt. Dazu wurde mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung der Methylierungsstatus des IFN γ -Promotors, des IL-4- und IL-5-Promotors und der Th2-genregulatorischen-Region CNS-1 von MNCs aus der Milz untersucht. Für den IFN γ -Promotor zeigten MNCs OVA-sensibilisierter und -provozierter Tiere positionsspezifische Methylierungsgrade von 36% (Position -198 relativ zum IFN γ TSS) bis 63% (Position -39). 5Aza-Behandlung bewirkte hier eine signifikante Erniedrigung der Methylierung an fast allen untersuchten CpG-Motiven, mit einem Methylierungsgrad von 31% an Position -198 bis 53% an Position -39, was dem Methylierungsgrad PBS-sensibilisierter Kontrolltiere entsprach.

Für die CNS-1-Region von MNCs OVA-sensibilisierter und -provozierter Tiere reichten die Methylierungsgrade von 46% (Position -8276 bezogen auf den IL-4 TSS) bis 94% an Position -8374, was bereits unter dem Methylierungsgrad PBS-sensibilisierter Kontrolltiere lag. Der IL-4-Promotor zeigte positionsspezifische Methylierungsgrade von 40% (Position -336 bezogen auf den IL-4 TSS) bis 71% (Position -321) und der IL-5-Promotor von 41% (Position +25 bezogen auf den IL-5 TSS) bis 100% (Position -302). 5Aza-Behandlung bewirkte am Th2-Lokus nur geringfügige nicht signifikante Änderungen in der DNA-Methylierung (Abb. 3.10). Damit zeigte sich, dass die 5Aza-Behandlung einen größeren Einfluss auf den IFN γ -Promotor hatte, als auf die Th2-Genregion, da sowohl der Demethylierungsgrad für die einzelnen CpG-Positionen, als auch die mittlere Demethylierung (dargestellt für den IFN γ -Promotor und CNS-1, Abb 3.11) im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe beim IFN γ -Promotor stärker ausgeprägt war. Dieses Ergebnis korrelierte mit der erhöhten IFN γ -Produktion durch MNCs 5Aza-behandelter OVA-sensibilisierter Tiere.

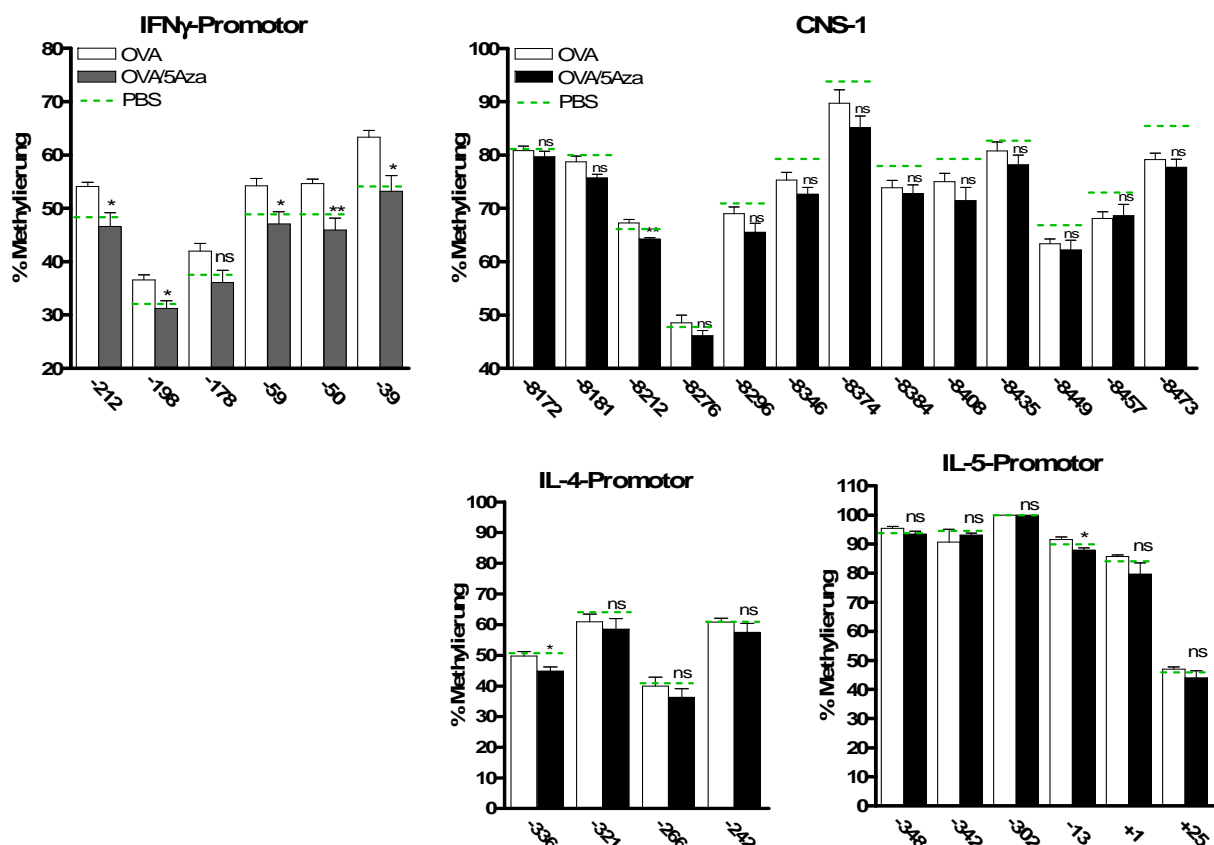


Abb. 3.10 5Aza beeinflusst Th1- und Th2-spezifische Genregionen unterschiedlich stark

Balb/c-Mäuse (n = 6 pro Gruppe) wurden beginnend zwei Wochen vor Sensibilisierung dreimal pro Woche mit 0,2 mg/kg 5Aza i.p. behandelt und anschließend mit 1% OVA-Aerosol an drei aufeinander folgenden Tagen provoziert. MNCs wurden aus der Milz der Tiere isoliert und der Methylierungsgrad des IFN γ -Promotors (Th1), sowie des IL-4- und IL-5-Promotors und der CNS-1-Region (Th2) mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung bestimmt. Die Positionen der CpG-Motive beziehen sich auf den TSS der beschriebenen Sequenzen NM_008337 für IFN γ und NM_021283 (IL-4) für IL-4 und CNS-1 und NM_010558 für IL-5.

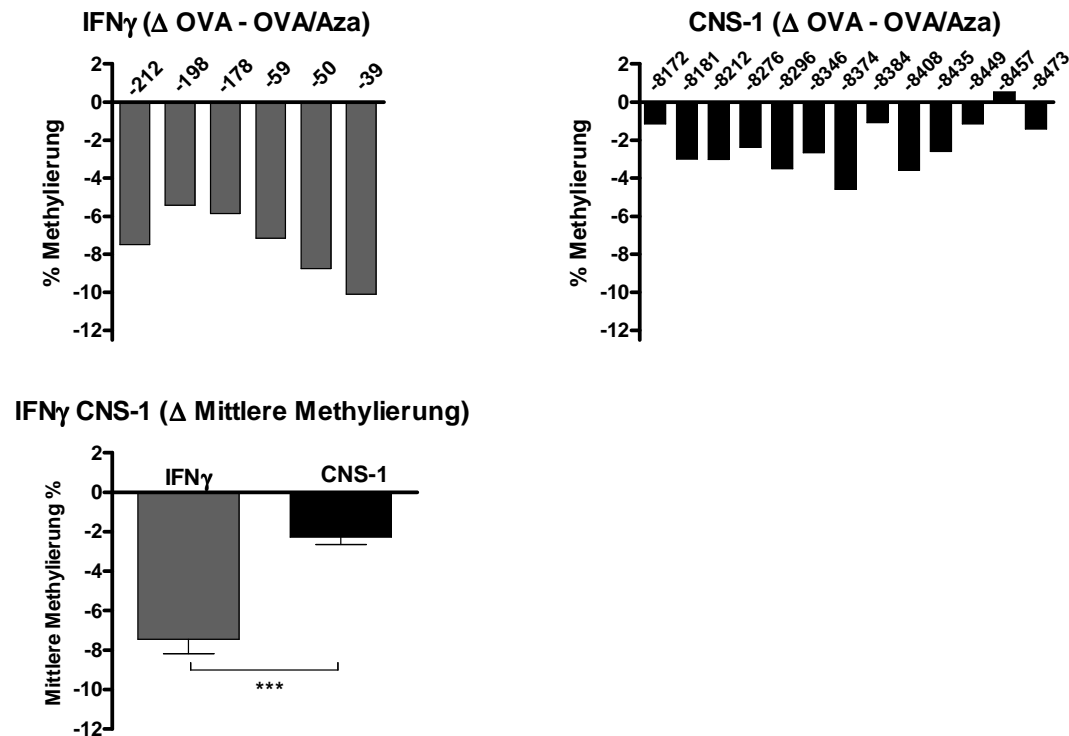


Abb. 3.11 5Aza beeinflusst den IFN γ -Promotor (Th1) und CNS-1 (Th2) unterschiedlich stark: Differenz zwischen PBS- und 5Aza-behandelten Tieren

Balb/c-Mäuse (n = 6 pro Gruppe) wurden beginnend zwei Wochen vor Sensibilisierung dreimal pro Woche mit 0,2 mg/kg 5Aza i.p. behandelt und anschließend mit 1% OVA-Aerosol an drei aufeinander folgenden Tagen provoziert. MNCs wurden aus der Milz der Tiere isoliert und der Methylierungsgrad des IFN γ -Promotors (Th1), sowie der CNS-1-Region (Th2) mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung bestimmt. Dargestellt sind Unterschiede im mittleren Methylierungsgrad des IFN γ - und CNS-1-Lokus zwischen 5Aza- und PBS-behandelten Tieren. Die Positionen der CpG-Motive beziehen sich auf den TSS der beschriebenen Sequenzen NM_008337 für IFN γ und NM_021283 (IL-4) für CNS-1.

3.1.4 Der Methylierungsgrad CD4⁺-T-Zellen spielt eine entscheidende Rolle für die Induktion der allergischen Atemwegsentzündung

Nachdem sich gezeigt hat, dass eine systemische Inhibition der DNA-Methylierung und der damit einhergehende erniedrigte DNA-Methylierungsgrad den asthmatischen Phänotyp beeinflusst, stellte sich die Frage nach dem Einfluss T-Zell spezifischer Methylierung, da T-Zellen, speziell CD4⁺-T-Helfer-Zellen, für die Entstehung und Ausprägung des asthmatischen Phänotyps eine entscheidende Rolle spielen (Barnes 2008, Galli 2008). Dazu wurde untersucht, ob sich der asthmatische Phänotyp mittels CD4⁺-T-Zellen 5Aza-behandelter Tiere, auf naive Mäuse übertragen lässt. Zur Durchführung wurden DO11.10-Mäuse (Donoren), welche transgen für einen OVA-spezifischen T-Zell-Rezeptor sind, zunächst mit 5Aza behandelt (Abb. 2.3). Die Behandlung startete zwei Wochen vor der ersten Sensibilisierung und dauerte bis sieben Tage nach der zweiten Sensibilisierung an. Anschließend wurde den Tieren die Milz entnommen, MNCs isoliert

und die Zellen für 72h mit 100 µg/mL OVA restimuliert. Nach der Restimulation erfolgte die Negativisolation CD4⁺-T-Zellen mittels Magnetbeads und 1x10⁷ Zellen pro Maus wurden in WT-Balb/c-Mäuse (Rezipienten) transferiert. Die Rezipienten wurden 24h vor Transfer und 2h, 48h und 96h nach Transfer mit OVA-Aerosol provoziert und 48h nach der letzten Provokation erfolgte die Analyse.

Um zu untersuchen, ob ein erfolgreicher Transfer der CD4⁺-T-Zellen stattgefunden hat, wurden zunächst MNCs aus den lungendrainierenden LK und der Milz der transferierten Tiere isoliert und sowohl CD4 als auch der OVA-spezifische-TCR DO11.10 mittels fluoreszenzmarkierten Antikörpern markiert und der Anteil DO11.10⁺ Zellen in den LK und der Milz mittels FACS analysiert. Hier zeigte sich wie erwartet, eine Akkumulation DO11.10⁺-Zellen in den Lungen-LK der Tiere, die mit OVA-Aerosol provoziert wurden, wobei kein Unterschied zwischen transferierten Zellen aus PBS- bzw. 5Aza-vorbehandelten Donoren vorhanden war. Damit konnte weiterhin dargestellt werden, dass 5Aza in diesem Modell keinen Einfluss auf das migratorische Verhalten der transferierten Zellen hatte. Als Kontrolle wurden zusätzlich Milzzellen angefärbt. Hier konnte nur ein sehr geringer Anteil DO11.10⁺-Zellen nachgewiesen werden, womit allerdings ebenfalls ein erfolgreicher Transfer bestätigt wurde (Abb. 3.12).

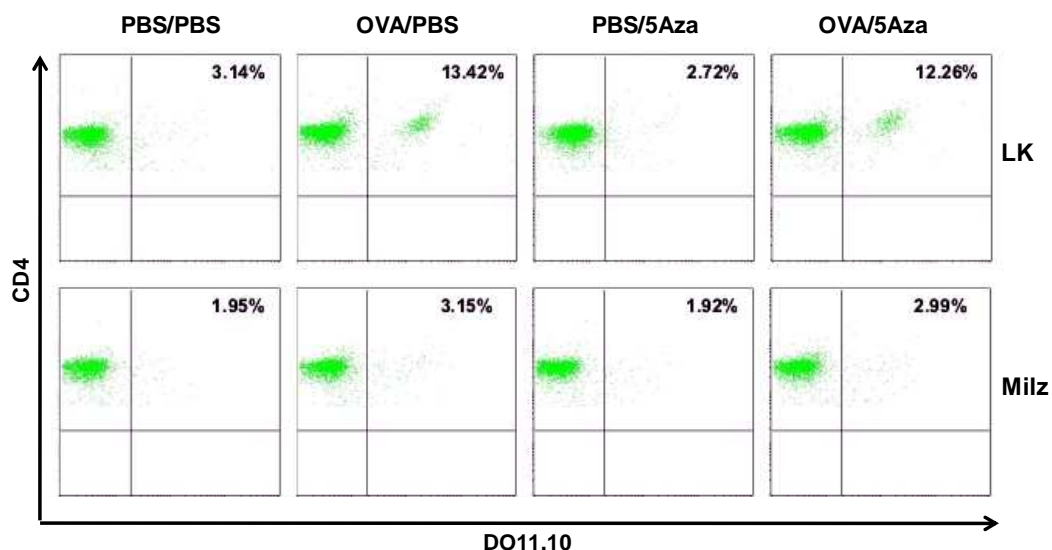


Abb. 3.12 Migration der transferierten CD4⁺-T-Zellen in die Lymphknoten der Lunge wird nicht durch 5Aza beeinflusst

DO11.10-Mäuse (Donoren; n = 4-6 pro Gruppe) wurden beginnend zwei Wochen vor Sensibilisierung dreimal pro Woche mit 0,2 mg/kg 5Aza i.p. behandelt. Anschließend erfolgte der Transfer von 1x10⁷ OVA-restimulierter CD4⁺-T-Zellen in naive WT-Balb/c-Mäuse (Rezipienten; n = 4-6 pro Gruppe), die 24h vor Transfer und 2h, 48h und 96h nach Transfer mit 1% OVA-Aerosol provoziert wurden. 48h nach der letzten Provokation wurden MNCs aus Lymphknoten und Milz (Negativ-Kontrolle) der Rezipienten isoliert und der Anteil DO11.10⁺- und CD4⁺-T-Zellen mittels FACS-Analyse bestimmt.

Bezüglich des asthmatischen Phänotyps zeigte sich, dass mittels Transfer von CD4⁺-T-Zellen OVA-sensibilisierter Donoren (DO11.10), ein asthmatischer Phänotyp in nicht-sensibilisierte WT-Balb/c-Mäuse als Rezipienten übertragen werden konnte. Diese Tiere entwickelten eine Atemwegshyperreaktivität gegenüber Methacholin, was sich in einer Verringerung der Lungenfunktion darstellte (Abb. 3.13A). Es kam weiterhin zu einer Entzündungsreaktion in den Atemwegen, hauptsächlich begleitet durch den Einstrom von Lymphozyten und die Anzahl von eosinophilen Granulozyten in der BAL war ebenfalls signifikant erhöht (Abb. 3.13B). Auch die histologische Analyse der Atemwege und des Lungengewebes zeigte eine Infiltration inflammatorischer Zellen (Abb. 3.14).

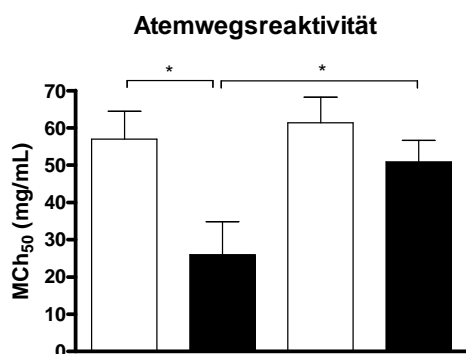
Nach dem Transfer von CD4⁺-T-Zellen 5Aza-behandelter OVA-sensibilisierter Tiere zeigte sich in Übereinstimmung mit dem Ergebnis nach systemischer 5Aza-Behandlung, dass der asthmatische Phänotyp in den Rezipienten stark vermindert war. Die Lungenfunktion war verbessert, der Anteil an Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten in der BAL war signifikant verringert und auch die BAL-Gesamtzellzahl war erniedrigt. Ferner zeigte sich bei der histologischen Auswertung des Lungengewebes (PAS-Färbung) eine starke Verminderung der Infiltration inflammatorischer Zellen. Weiterhin bestätigte sich auch hier, dass alleinige 5Aza-Behandlung als Kontrolle keinerlei Auswirkungen auf Parameter des asthmatischen Phänotyps hatte, die vergleichbar den Ergebnissen der PBS-Kontrollgruppe waren.

Die Analyse des Zytokinprofils von MNCs der lungendrainierenden Lymphknoten nach OVA-Restimulation zeigte, dass sowohl die Produktion der Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, als auch die Produktion des Th1-Zytokins IFN γ deutlich erhöht war. Damit bestätigte sich auch hier die erfolgreiche Übertragung des allergischen Phänotyps durch den adoptiven Transfer. Nach Transfer CD4⁺-T-Zellen OVA-sensibilisierter und 5Aza-behandelter Tiere ergab sich, vergleichbar mit den Ergebnissen nach systemischer 5Aza-Gabe, eine Verschiebung der Th1/Th2-Balance in Th1-Richtung nach 5Aza-Behandlung. So war die IFN γ -Produktion im Vergleich zur OVA-Kontrollgruppe deutlich erhöht, während die Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 stark supprimiert waren. Auch hier zeigte eine alleinige 5Aza-Behandlung keinerlei Einfluss auf die Zytokinproduktion, die Werte entsprachen denen der PBS-Kontrollgruppe (Abb. 3.15A).

Zusätzlich erfolgte die Analyse der Zytokinproduktion nach OVA-Restimulation von MNCs aus der Milz, obwohl der Großteil der transferierten OVA_{Atg}-T-Zellen aufgrund der vorherigen OVA-Aerosol-Provokation der Rezipienten unverzüglich in die Lunge und die lungendrainierenden Lymphknoten wandert und über den Zeitraum der andauernden OVA-

Aerosol-Provokation auch dort verbleibt. Hier zeigte sich, dass schon der geringe Anteil an OVA_{tg}-Zellen in der Milz ausreichend ist (Abb. 3.12), um auf OVA-Restimulation mit einer erhöhten Produktion der Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 zu reagieren. Nach Transfer von Zellen 5Aza-behandelter Donoren, konnte auch hier tendenziell eine Verringerung der IL-4, IL-5 und IL-13-Produktion und eine Erhöhung der IFN γ -Produktion in den Milzzellen nachgewiesen werden (Abb. 3.15B).

A



B

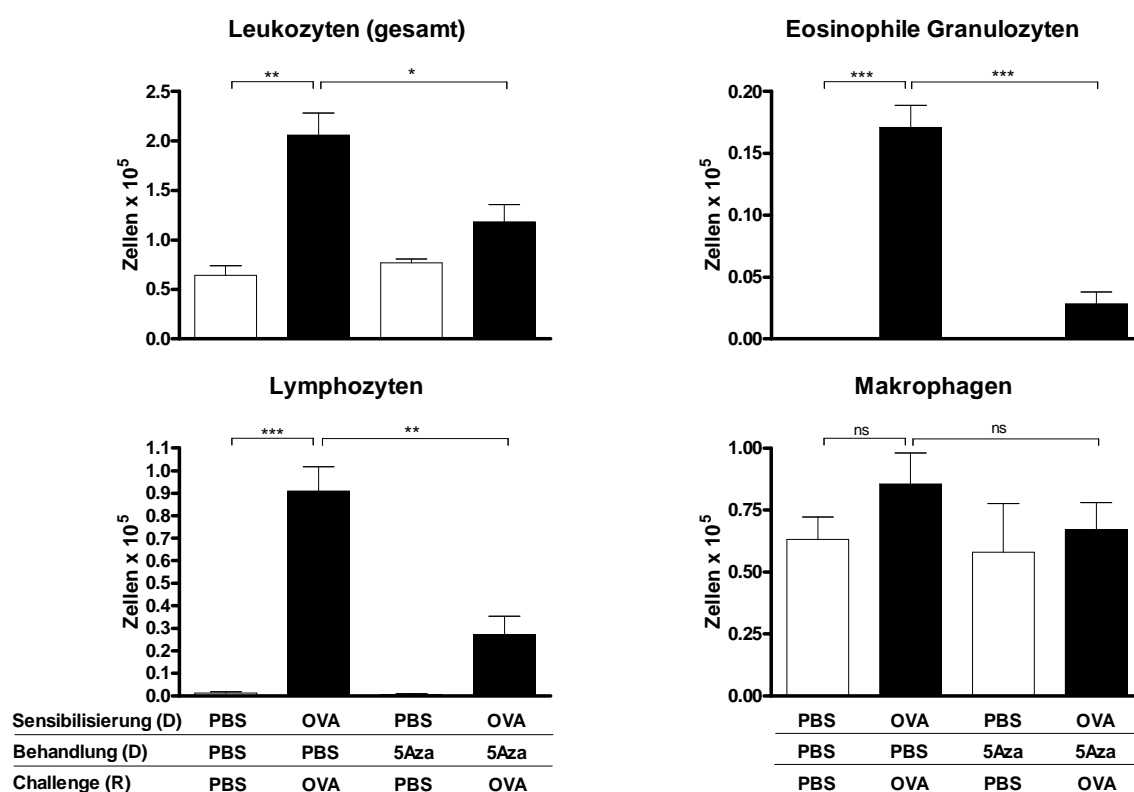


Abb. 3.13 Verminderter asthmatischer Phänotyp nach adoptivem Transfer CD4⁺-T-Zellen 5-Aza-2'-Deoxycytidin behandelter Tiere

DO11.10-Mäuse (Donoren; n = 4-6 pro Gruppe) wurden beginnend zwei Wochen vor Sensibilisierung dreimal pro Woche mit 0,2 mg/kg 5Aza i.p. behandelt. Anschließend erfolgte der Transfer von 1×10^7 OVA-restimulierten CD4⁺-T-Zellen in naive WT-Balb/c-Mäuse (Rezipienten; n = 4-6 pro Gruppe), die 24h vor Transfer und 2h, 48h und 96h nach Transfer mit 1% OVA-Aerosol provoziert wurden. (A) 24h nach der letzten OVA-Provokation erfolgte die Analyse der Atemwegsreaktivität. (B) Differenzierung der Leukozyten in der BAL-Flüssigkeit 5Aza- und PBS-behandelter Tiere. (D) = Donoren, (R) = Rezipienten.

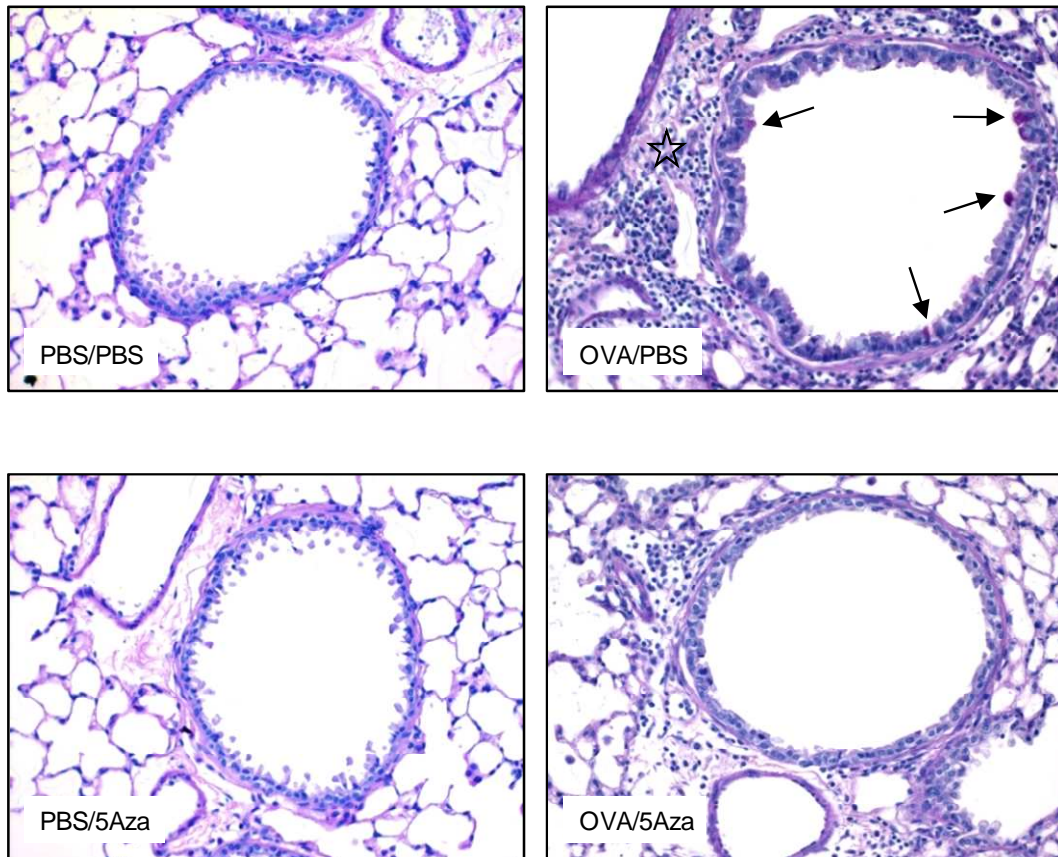
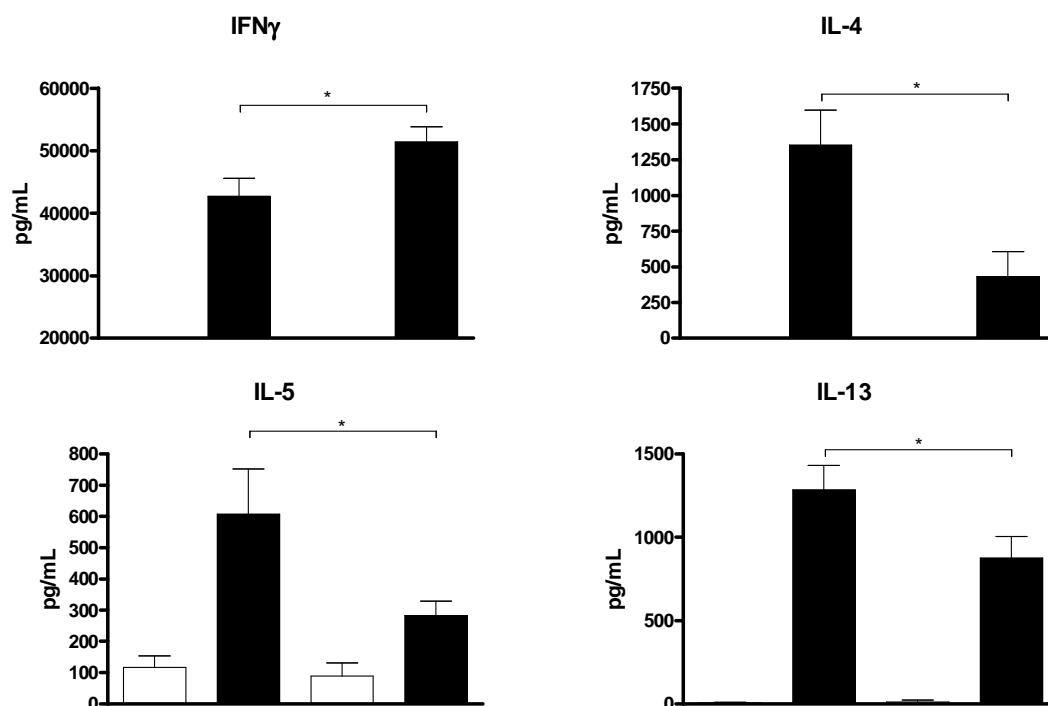


Abb. 3.14 5-Aza-2'-Deoxycytidinbehandlung verhindert inflammatorische Reaktion im Lungengewebe nach Transfer $CD4^+$ -T-Zellen

DO11.10-Mäuse (Donoren; $n = 4-6$ pro Gruppe) wurden beginnend zwei Wochen vor Sensibilisierung dreimal pro Woche mit 0,2 mg/kg 5Aza i.p. behandelt. Anschließend erfolgte der Transfer von 1×10^7 OVA-restimulierten $CD4^+$ -T-Zellen in naive WT-Balb/c-Mäuse (Rezipienten; $n = 4-6$ pro Gruppe), die 24h vor Transfer und 2h, 48h und 96h nach Transfer mit 1% OVA-Aerosol provoziert wurden. Histologische Darstellung der Infiltration inflammatorischer Zellen in das Lungengewebe, sowie des Anteils mukusproduzierender Becherzellen (lila) in den Atemwegen mittels PAS-Färbung. (\uparrow) = Becherzellen, (\star) = inflammatorisches Infiltrat.

Zusammenfassend ließ sich daher zeigen, dass $CD4^+$ -T-Zellen 5Aza-behandelter OVA-sensibilisierter Tiere im Gegensatz zu vergleichbaren Zellen aus unbehandelten Tieren nicht in der Lage waren, den kompletten asthmatischen Phänotyp auf WT-Balb/c-Rezipienten zu übertragen. Damit konnte dargestellt werden, dass der Methylierungsgrad $CD4^+$ -T-Zellen einen entscheidenden Einfluss, sowohl auf die Sensibilisierung gegenüber OVA hat, als auch auf die Ausprägung des Phänotyps von experimentellem Asthma im Mausmodell.

A



B

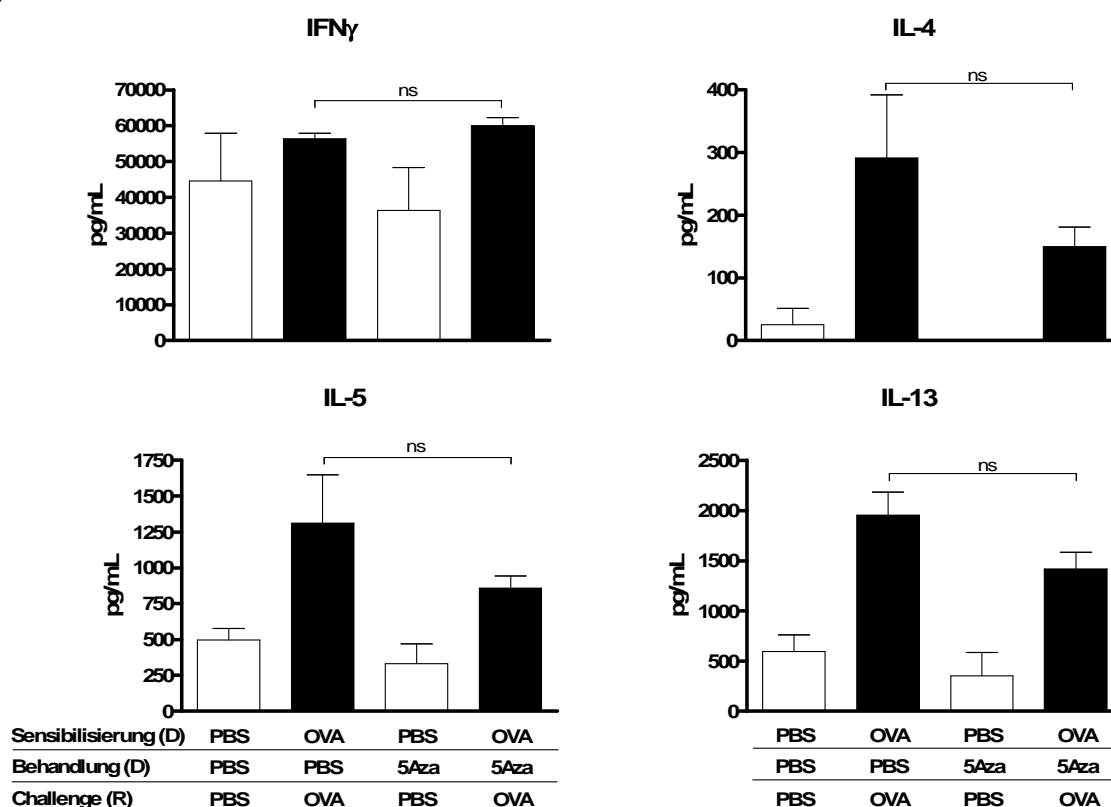


Abb. 3.15 5-Aza-2'-Deoxycytidinbehandlung führt zu Veränderung der Th1/Th2-Balance

DO11.10-Mäuse (Donoren; n = 4-6 pro Gruppe) wurden beginnend zwei Wochen vor Sensibilisierung dreimal pro Woche mit 0,2 mg/kg 5Aza i.p. behandelt. Anschließend erfolgte der Transfer von 1×10^7 OVA-restimulierten CD4⁺-T-Zellen in naive WT-Balb/c-Mäuse (Rezipienten; n = 4-6 pro Gruppe), die 24h vor Transfer und 2h, 48h und 96h nach Transfer mit 1% OVA-Aerosol provoziert wurden. 48h nach der letzten Provokation wurden MNCs (**A**) der lungendrainierenden Lymphknoten und (**B**) der Milz isoliert, mit OVA restimuliert und die Zytokine im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. (D) = Donoren, (R) = Rezipienten.

3.2 Epigenetische Regulation der Asthmaprotektion durch das apathogene Bakterium *Acinetobacter lwoffii* F78

3.2.1 Pränatale *A. lwoffii* F78-Exposition beeinflusst die Th1/Th2-Balance

Der Nachweis, dass pränatale Exposition mit dem Bakterium *A. lwoffii* F78 zu einer allgemeinen Unterdrückung des asthmatischen Phänotyps im Mausmodell des experimentellen Asthmas führt, konnte innerhalb der Arbeitsgruppe bereits erbracht werden (Conrad 2009). Hier wurden Balb/c-Mäuse vor und während der Schwangerschaft intranasal mit dem Bakterium *A. lwoffii* F78 behandelt. Die weiblichen Nachkommen dieser Tiere wurden anschließend zur Induktion experimentellen Asthmas mit OVA sensibilisiert und mit OVA-Aerosol provoziert (Abb. 2.4).

Unter Anwendung dieses Protokolls wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst die Zytokinproduktion mononukleärer Zellen aus der Milz näher untersucht.

Hier konnte gezeigt werden, dass die bereits beschriebenen asthmaprotektiven Effekte einhergingen mit einer signifikanten Verschiebung der Th1/Th2-Balance in MNCs der Milz. So kam es neben einer verstärkten Produktion des Th1-Zytokins IFN γ zu einer Suppression der Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 nach *in vitro* Stimulation von MNCs aus der Milz mittels anti-CD3/anti-CD28, was sowohl auf Protein- (Abb. 3.16A), als auch auf RNA-Ebene nachweisbar war (Abb. 3.16B). Die Produktion des Zytokins IL-10, als Marker für regulatorische T-Zellen wurde durch pränatale *A. lwoffii* F78-Exposition nicht beeinflusst (Abb. 3.17A) und auch der Anteil CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺-Zellen in der Milz, ermittelt mittels FACS-Analyse, zeigte sich nicht verändert (Abb. 3.17B).

Diese Verschiebung in der Produktion der Th1/Th2-Zytokine diene als Grundlage für die nächsten Experimente, in denen deren eventuelle molekulare Ursachen untersucht werden sollten.

3.2.2 Die Asthma-Protektion durch pränatale *A. lwoffii* F78-Exposition ist abhängig von der erhöhten IFN γ -Produktion in den Nachkommen

Um zu untersuchen, ob die reduzierte Th2-Antwort nach pränataler *A. lwoffii* F78 Exposition durch die erhöhte IFN γ -Produktion in den Nachkommen bedingt ist, wurde IFN γ in den Tieren mittels eines neutralisierenden, monoklonalen anti-IFN γ -Antikörpers funktionell blockiert.

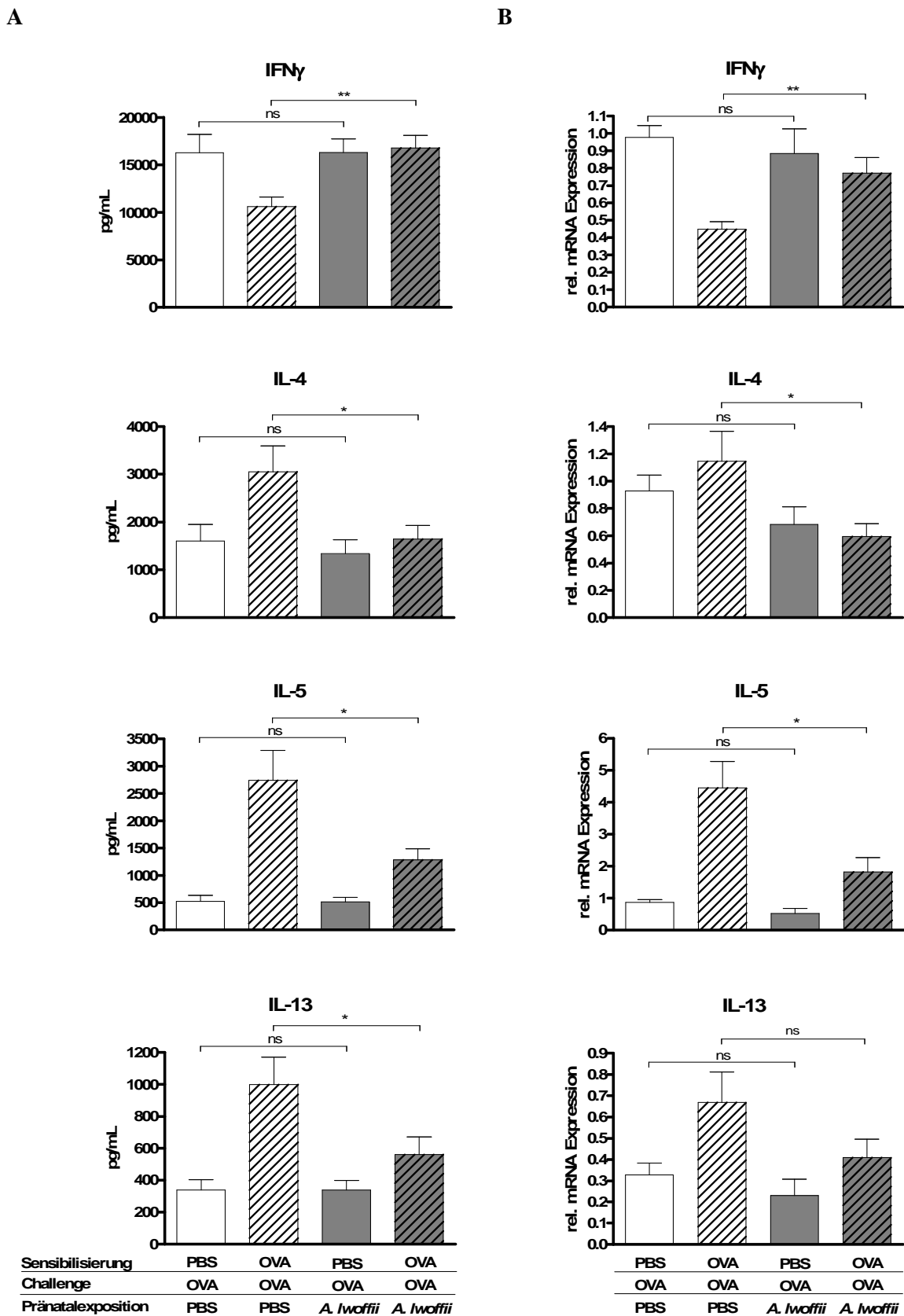


Abb. 3.16 Veränderte Th1/Th2-Zytokinproduktion nach pränataler *A. Iwoffii* F78-Exposition
Weiblichen Balb/c-Mäusen wurde vor und während der Schwangerschaft *A. Iwoffii* F78 (1×10^8 CFU) intranasal appliziert. Die Nachkommen dieser Mütter ($n = 4-8$ pro Gruppe) wurden mit OVA sensibilisiert und provoziert. MNCs wurden aus der Milz isoliert, mit anti-CD3/anti-CD28 stimuliert und (A) die Th1- und Th2-Zytokine auf Proteinebene mittels ELISA bestimmt. (B) mRNA-Expression anti-CD3/anti-CD28-stimulierter CD4⁺CD25⁺-T-Zellen (bezogen auf CD3d mRNA-Expression).

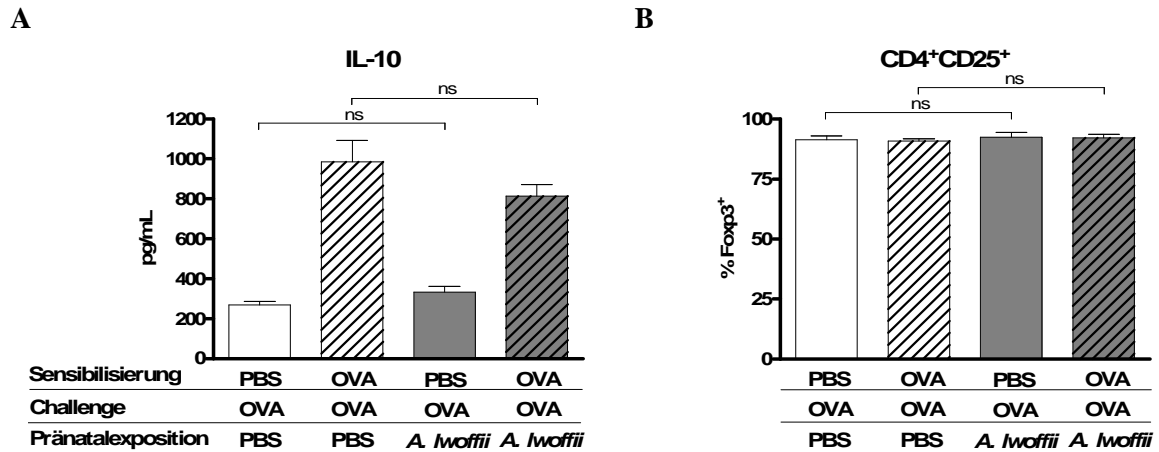


Abb. 3.17 Keine Beeinflussung von Tregs nach pränataler *A. Iwoffii* F78-Exposition

Weiblichen Balb/c-Mäusen wurde vor und während der Schwangerschaft *A. Iwoffii* F78 (1×10^8 CFU) intranasal appliziert. Die Nachkommen dieser Mütter ($n = 4-8$ pro Gruppe) wurden mit OVA sensibilisiert und provoziert. MNCs wurden aus der Milz isoliert, mit anti-CD3/anti-CD28 stimuliert. **(A)** Bestimmung von IL-10 als Marker für regulatorische T-Zellen im Zellkulturüberstand mittels ELISA. **(B)** FACS-Analyse des Anteils Foxp3⁺-Zellen innerhalb der CD4⁺CD25⁺-T-Zell-Subpopulation der Milz.

Dazu wurde den pränatal *A. Iwoffii* F78-exponierten Tieren 24h vor der ersten OVA-Aerosol-Provokation, sowie 30 Minuten vor den jeweiligen weiteren Provokationen 100 µg anti-IFN γ proTier intravenös appliziert (Abb. 2.5). Hierbei zeigte sich, dass durch die anti-IFN γ -Behandlung die durch das Bakterium *A. Iwoffii* F78-vermittelte Asthma-Protektion (Conrad 2009) komplett aufgehoben wurde. So war sowohl die Entwicklung einer Atemwegshyperreaktivität (Abb. 3.18A), als auch der Grad der Atemwegs-entzündung, die sich nach pränataler *A. Iwoffii* F78-Exposition reduziert darstellten, komplett wiederhergestellt. Dies zeigte sich in einer wiederhergestellten erhöhten Anzahl an Leukozyten in der BAL, welche bedingt war durch einen Anstieg an eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten. Die Anzahl dieser Zellen war der in den pränatal PBS-exponierten und OVA-sensibilisierten Tieren vergleichbar (Abb. 3.18B). Weiterhin bestätigte auch die histologische Auswertung des Lungengewebes nach PAS-Färbung die Wiederherstellung der Atemwegs-entzündung nach anti-IFN γ -Behandlung. So stieg sowohl der Entzündungsgrad im Lungengewebe wieder an, als auch die Anzahl an mukusproduzierenden Becherzellen in den Atemwegen. Der Entzündungsgrad in den Lungen der anti-IFN γ behandelten Tiere war somit vergleichbar mit dem in Lungen von pränatal PBS-exponierten und OVA-sensibilisierten Kontrolltieren (Abb. 3.18C).

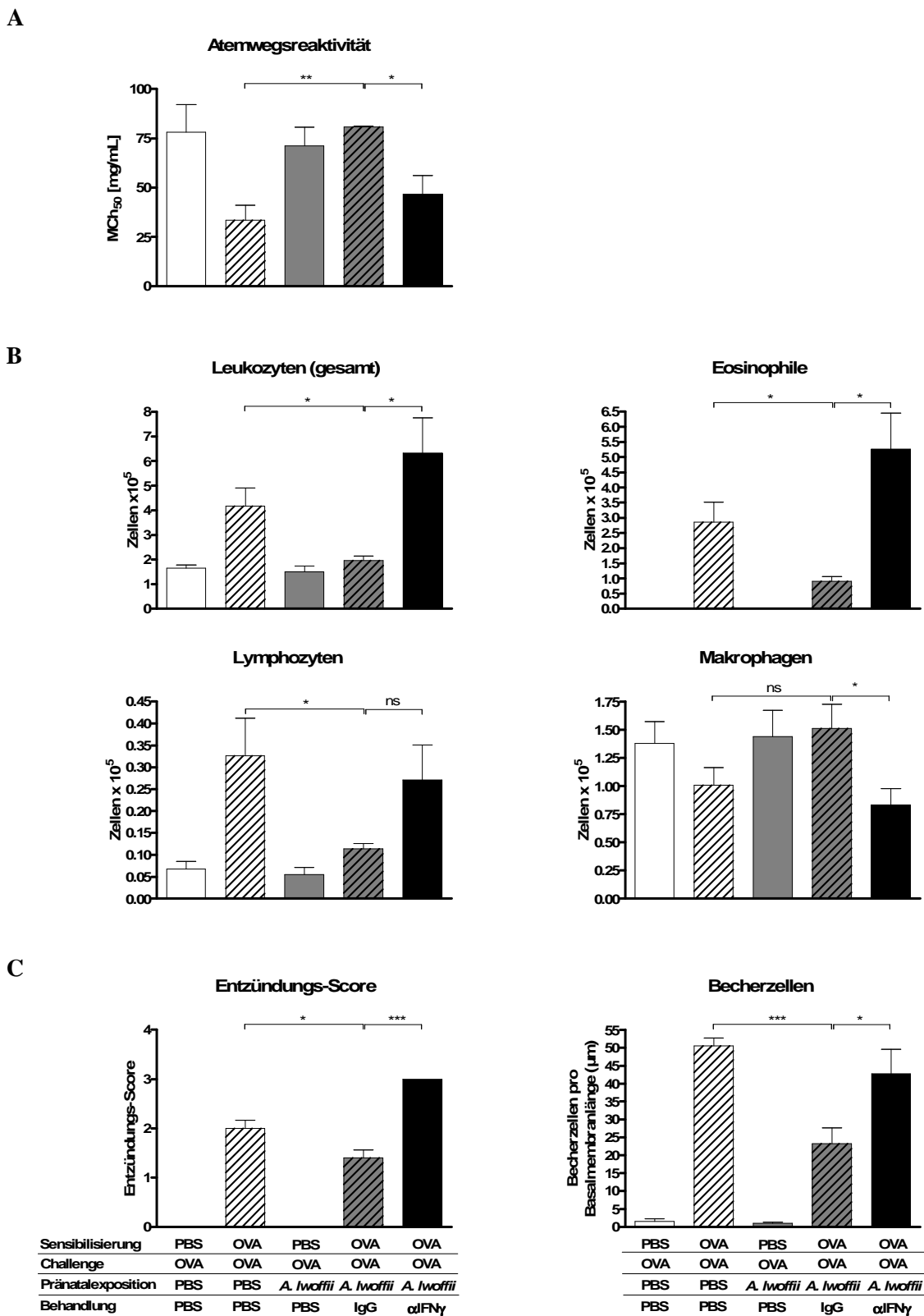


Abb. 3.18 Anti-IFN γ -Behandlung führt zur Wiederherstellung des asthmatischen Phänotyps
Weiblichen Balb/c-Mäusen wurde vor und während der Schwangerschaft *A. lwoffii* F78 (1×10^8 CFU) intranasal appliziert. Die Nachkommen dieser Mütter ($n = 4-8$ pro Gruppe) wurden mit OVA sensibilisiert und provoziert und ein Teil der Nachkommen wurde während der Provokation mit einem neutralisierenden anti-IFN γ -Antikörper i.v. behandelt. (A) 24h nach der letzten OVA-Provokation erfolgte die Analyse der Atemwegsreaktivität mittels Head-Out-Body-Plethysmographie. (B). Differenzierung der Leukozyten in der BAL-Flüssigkeit. (C) Semiquantitative Analyse der Atemwegsinflammation und des Anteils Mukusproduzierender Becherzellen in den Atemwegen der pränatal behandelten Nachkommen.

Neben der Bestimmung des asthmatischen Phänotyps, wurde zur Untersuchung des funktionellen Einflusses der anti-IFN γ -Behandlung zusätzlich die Produktion sowohl von IFN γ selbst, als auch die von IL-5 durch stimulierte MNCs aus der Milz analysiert. Hier zeigte sich, dass die *in vivo* Blockade von IFN γ zu einer signifikant erhöhten IL-5-Produktion, bei einer unverändert erhöhten IFN γ -Produktion dieser Zellen führte (Abb. 3.19). Dies weist auf einen regulatorischen Einfluss von IFN γ auf die Produktion von Th2-Zytokinen in diesem Modell hin. Als generelle Kontrolle erfolgte in diesem Versuchsansatz die Behandlung mit Ratten-IgG-Antikörpern, was keinerlei Einfluss auf den asthmaprotektiven Effekt zeigte.

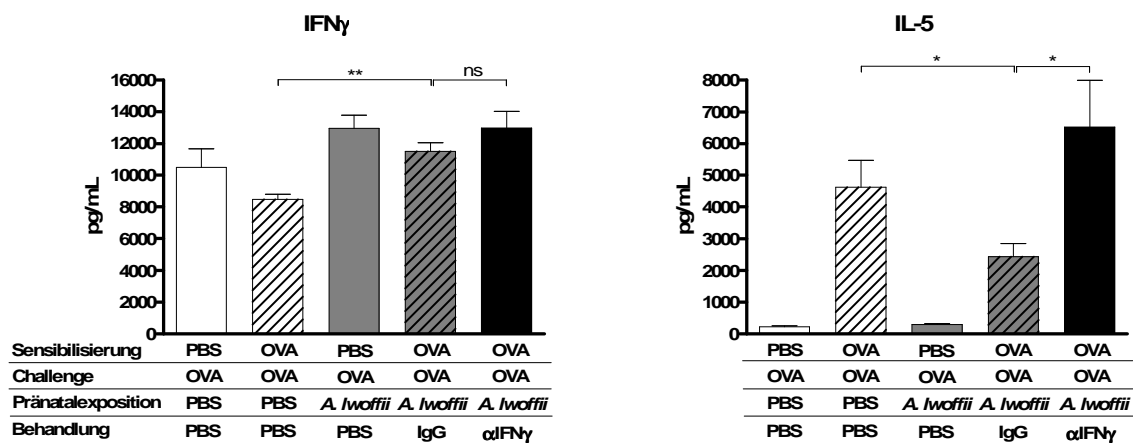


Abb. 3.19 Wiederherstellung der IL-5-Produktion von Milz-MNCs nach anti-IFN γ -Behandlung
Weiblichen Balb/c-Mäusen wurde vor und während der Schwangerschaft *A. lwoffii* F78 (1×10^8 CFU) intranasal appliziert. Die Nachkommen dieser Mütter ($n = 4-8$ pro Gruppe) wurden mit OVA sensibilisiert und provoziert und ein Teil der Nachkommen wurde während der Provokation mit einem neutralisierenden anti-IFN γ -Antikörper i.v. behandelt. Anschließend wurden MNCs aus der Milz isoliert, für 24h mit anti-CD3/anti-CD28 stimuliert und die Zytokine im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt.

3.2.3 Epigenetische Regulation nach pränataler *A. lwoffii* F78-Exposition

3.2.3.1 Pränatale *A. lwoffii* F78-Exposition beeinflusst H4-Acetylierung, aber nicht DNA-Methylierung am IFN γ -Promotor

Da IFN γ bei der *A. lwoffii* F78-vermittelten Prävention des asthmatischen Phänotyps eine essentielle Rolle spielt, wurde hier untersucht, ob DNA-Methylierung innerhalb des IFN γ -Promotors einen möglichen Mechanismus für die Regulation der Zytokinproduktion darstellt. Dazu wurden wiederum weibliche Balb/c-Mäuse vor und während der

Schwangerschaft intranasal mit *A. lwoffii* F78 behandelt und deren Nachkommen mit OVA sensibilisiert und provoziert (Abb. 2.4).

Um Tregs aus der Analyse auszuschließen wurden nach der OVA-Provokation aus der Milz dieser Tiere $CD4^+CD25^-$ -T-Zellen isoliert und der DNA-Methylierungsgrad am IFN γ -Promotor im Vergleich zu pränatal PBS-exponierten Tieren untersucht, wobei der IFN γ -Promotor sechs CpG-Motive enthält, von denen bereits gezeigt wurde, dass sie eine wichtige Rolle für die IFN γ -Genexpression spielen (Jones 2006). Mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung dieser sechs CpG-Motive bei $CD4^+CD25^-$ -T-Zellen konnte hier gezeigt werden, dass generell ein relativ niedriges absolutes Methylierungsniveau am IFN γ -Promotor vorhanden ist. Die Spanne des Methylierungsgrades reichte von 11% an Position -50 (in Bezug auf den TSS) bis 17% an Position -59 in naiven Mäusen (Abb. 3.20). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass weder die OVA-Sensibilisierung, noch die pränatale Exposition mit *A. lwoffii* F78, noch die Kombination von beidem zu einer signifikanten Veränderung des CpG-Methylierungsniveaus innerhalb des IFN γ -Promotors führte. Da jedoch die IFN γ -Produktion in den pränatal *A. lwoffii* F78-exponierten OVA-sensibilisierten Tieren im Vergleich zur PBS-exponierten OVA-Gruppe signifikant erhöht war (Abb. 3.16), führte dieses Ergebnis zu der Schlussfolgerung, dass in diesem Modell die IFN γ -Produktion nicht durch den Methylierungsstatus am proximalen IFN γ -Promotor bestimmt wird.

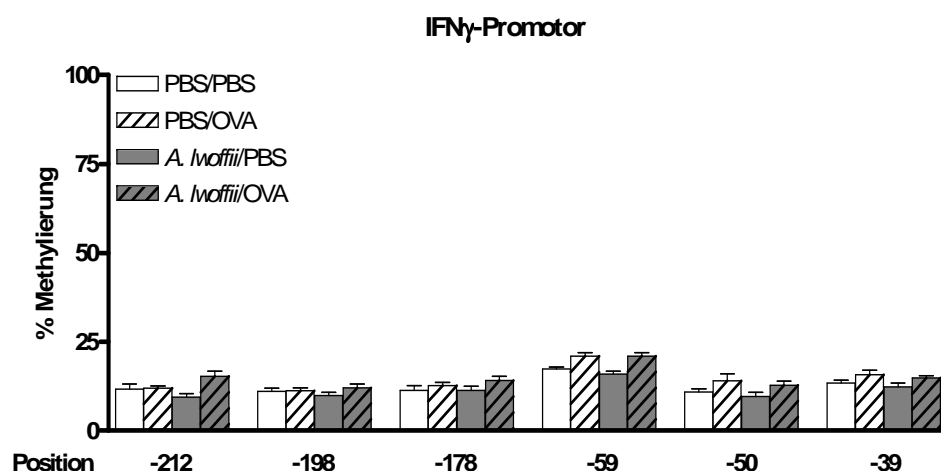


Abb. 3.20 Unveränderte CpG-Methylierung am IFN γ -Promotor nach pränataler *A. lwoffii* F78-Exposition

Weiblichen Balb/c-Mäusen wurde vor und während der Schwangerschaft *A. lwoffii* F78 (1×10^8 CFU) intranasal appliziert. Die Nachkommen dieser Mütter ($n = 4-8$ pro Gruppe) wurden mit OVA sensibilisiert und provoziert. Anschließend wurden $CD4^+CD25^-$ -T-Zellen aus der Milz dieser Tiere isoliert und der Methylierungsgrad für sechs CpG-Motive des IFN γ -Promotors mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung bestimmt. Die Positionen der CpG-Motive beziehen sich auf den Transkriptionsstart der beschriebenen Sequenz NM_008337 (IFN γ).

Neben der DNA-Methylierung spielen posttranslationale Modifikationen von Histonproteinen eine wichtige Rolle in der Regulation der Chromatinstruktur, resultierend in einem geöffneten (transkriptionell aktivem) oder geschlossenem (transkriptionell reprimierten) Chromatinstatus. Daher wurden neben dem DNA-Methylierungsgrad am IFN γ -Promotor auch Histon H4-Acetylierung (H4ac, aktivierend) und Histon H3 Lysin 27-Trimethylierung (H3K27me3, repressiv) mittels ChIP und anschließender quantitativer PCR untersucht. Hier konnte festgestellt werden, dass OVA-sensibilisierte Nachkommen PBS-exponierter Mütter (PBS/OVA) eine signifikant geringere H4-Acetylierung am IFN γ -Promotor aufweisen im Vergleich zu nicht sensibilisierten Nachkommen PBS-exponierter Mütter (PBS/PBS) (Abb. 3.21). Dies impliziert einen Einfluss von OVA-Sensibilisierung und Provokation auf den Grad der H4-Acetylierung. Alleinige pränatale *A. lwoffii* F78-Exposition (*A. lwoffii*/PBS) zeigte keinen Effekt auf die H4-Acetylierung, welche vergleichbar war der pränatal PBS-exponierten Kontrollgruppe (PBS/PBS). In den Nachkommen von *A. lwoffii* F78-exponierten Müttern (*A. lwoffii*/OVA) jedoch, war der Einfluss von OVA-Sensibilisierung und Provokation auf den H4-Acetylierungsgrad nicht nachweisbar. Diese Veränderung der H4-Acetylierung korrelierte mit der erhöhten IFN γ -Produktion von MNCs aus der Milz nach pränataler *A. lwoffii* F78-Exposition auf Proteinebene (Abb 3.16A), als auch mit der erhöhten IFN γ -Produktion von CD4⁺CD25⁻-T-Zellen auf mRNA-Ebene (Abb 3.16B).

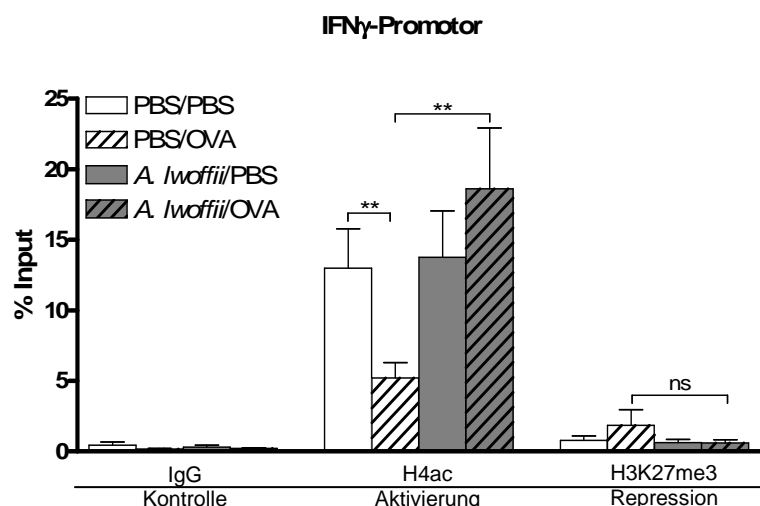


Abb. 3.21 Pränatale *A. lwoffii* F78-Exposition führt zu einer erhöhten H4-Acetylierung am IFN γ -Promotor

Weiblichen Balb/c-Mäusen wurde vor und während der Schwangerschaft *A. lwoffii* F78 (1×10^8 CFU) intranasal appliziert. Die Nachkommen dieser Mütter ($n = 4-8$ pro Gruppe) wurden mit OVA sensibilisiert und provoziert. Anschließend wurden CD4⁺CD25⁻-T-Zellen aus der Milz dieser Tiere isoliert und die H4-Acetylierung (H4ac) sowie die H3 Lysin 27-Trimethylierung (H3K27me3) am IFN γ -Promotor mittels ChIP analysiert.

Bezüglich der H3K27-Trimethylierung am IFN γ -Promotor ging der Methylierungsgrad kaum über die Werte der IgG-Kontrolle hinaus (Abb. 3.20) und zwischen den einzelnen Studiengruppen konnten keine signifikanten Veränderungen detektiert werden, dies deutet darauf hin, dass dieser Marker für repressives Chromatin nicht in die Regulation der IFN γ -Expression in diesem Modell involviert ist.

3.2.3.2 Pränatale *A. lwoffii*-Exposition führt zur epigenetischen Modulation am IL-4-Promotor sowie an einer übergeordneten genregulatorischen Region (CNS-1) des Th2-Lokus

Um zu untersuchen, ob die veränderte Expression der Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 durch DNA-Methylierung reguliert ist, wurden zunächst CpG-Motive innerhalb der Promotorregionen der Gene für IL-4 und IL-5 von CD4⁺CD25⁻-T-Zellen untersucht. Im Gegensatz zum IFN γ -Promotor zeigte sich hier eine wesentlich höhere Grundmethylierung. Die Spanne reichte von 29% an Position -266 bis 60% an Position -336 für IL-4 (bezogen auf den TSS) und von 47% an Position +25 bis 100% an Position -302 für IL-5 (bezogen auf den TSS) (Abb. 3.22). Es kam jedoch weder durch die Sensibilisierung und Provokation mit OVA, noch durch alleinige pränatale *A. lwoffii* F78-Exposition, noch durch die Kombination von beidem zu einer Veränderung des Methylierungsgrades (Abb. 3.22), obwohl die Protein- und RNA-Level für IL-4 und IL-5 signifikant reduziert waren (Abb. 3.16).

Neben den Promotorregionen von IL-4 und IL-5 wurde auch das Methylierungsmuster einer übergeordneten genregulatorischen Region der Th2-Genregion, der Conserved Noncoding Sequence-1 (CNS-1), untersucht. Hier kam es, im Gegensatz zum IL-4-, IL-5- und IFN γ -Promotor zu einer Beeinflussung innerhalb der CNS-1-Region durch OVA-Sensibilisierung und -Provokation in den Nachkommen PBS-exponierter Mütter. Fünf der dreizehn mittels Pyrosequenzierung analysierten CpG-Motive zeigten hier eine Reduktion im Methylierungsgrad von mehr als 5% (Abb. 3.22; Positionen -8457, -8435, -8384, -8374 und -8346 bezogen auf den IL-4 TSS). Pränatale *A. lwoffii* F78-Exposition per se hatte keinen signifikanten Effekt auf die CpG-Methylierung innerhalb dieser Region (Vergleich: Gruppen PBS/PBS und *A. lwoffii*/PBS). Nach OVA-Sensibilisierung und -Provokation jedoch zeigten Nachkommen *A. lwoffii* F78-exponierter Mütter eine komplette Aufhebung der OVA-induzierten Reduktion des Methylierungsgrades an sechs der dreizehn analysierten CpG-Motive (Abb. 3.22), wobei die Positionen -8435 (+5% im

Vergleich zu PBS/OVA), -8384 (+8%) und -8374 (+11%) statistische Signifikanz aufwiesen.

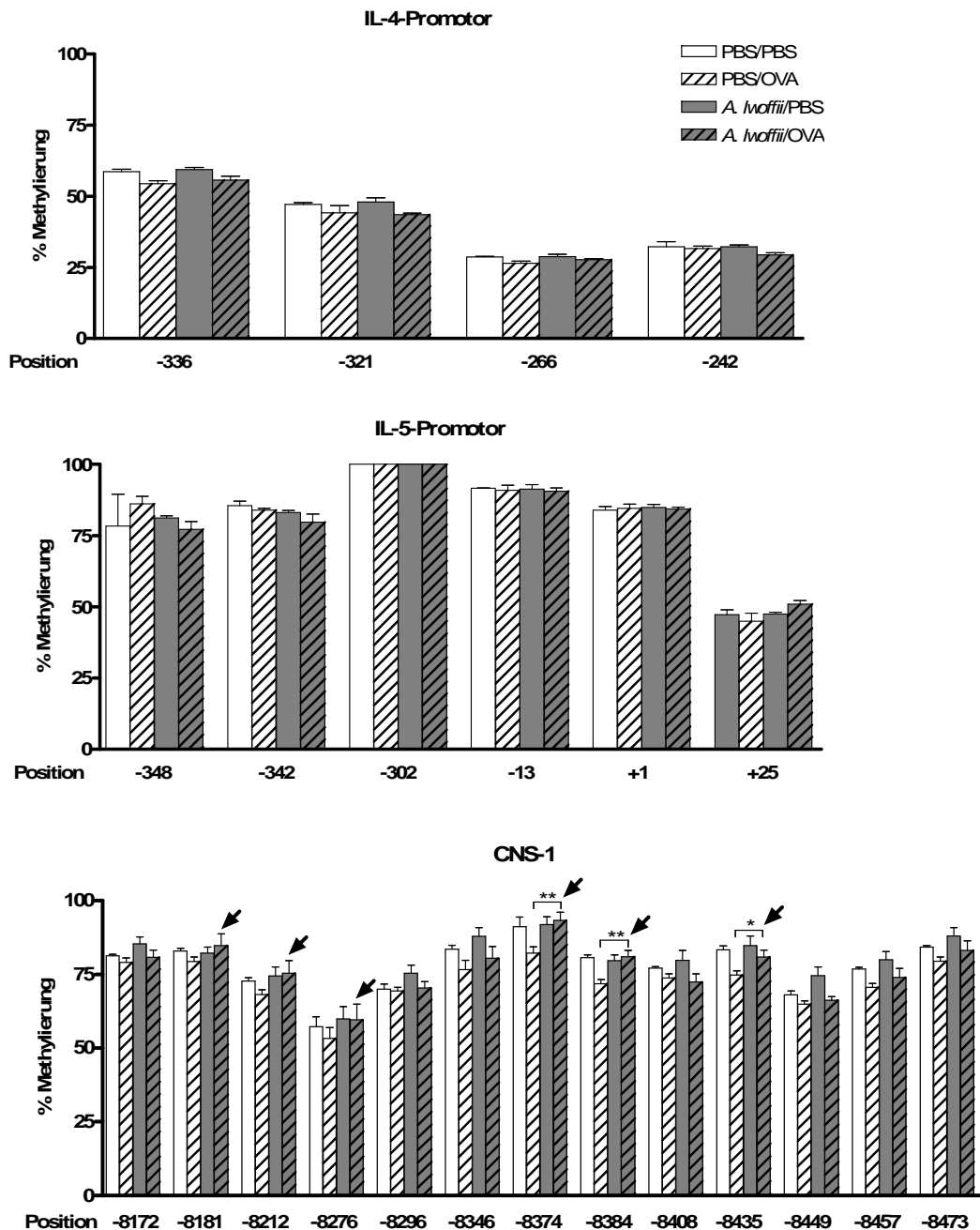


Abb. 3.22 CpG-Methylierung des IL-4- und IL-5-Promotors sowie der Th2-regulatorischen Region CNS-1 nach pränataler *A. Iwoffii* F78-Exposition

Weiblichen Balb/c-Mäusen wurde vor und während der Schwangerschaft *A. Iwoffii* F78 (1×10^8 CFU) intranasal appliziert. Die Nachkommen dieser Mütter ($n = 4-8$ pro Gruppe) wurden mit OVA sensibilisiert und provoziert. Anschließend wurden $CD4^+CD25^-$ -T-Zellen aus der Milz dieser Tiere isoliert und der Methylierungsgrad für vier CpG-Motive des IL-4-Promotors, sechs CpG-Motive des IL-5-Promotors und 13 CpG-Motive der CNS-1-Region mittels Bisulfit-Pyrosequenzierung bestimmt. Die Positionen der CpG-Motive beziehen sich auf den Transkriptionsstart der beschriebenen Sequenzen NM_010558 (IL-5) und NM_021283 (IL-4) für IL-4 und CNS-1. Pfeile (↓) kennzeichnen Positionen mit Unterschieden zwischen pränataler PBS- und *A. Iwoffii* F78-Exposition, wobei signifikante Unterschiede mit (*) gekennzeichnet sind.

In Bezug auf Histonmodifizierungen des Th2-Lokus zeigte sich nur im Bereich des IL-4-Promotors eine Erniedrigung der H4-Acetylierung nach pränataler *A. lwoffii* F78-Exposition, aber keine Veränderung der H3K27-Trimethylierung. Für die weiteren untersuchten Regionen (IL-5-Promotor und CNS-1) konnte weder in Bezug auf H4-Acetylierung noch auf H3K27-Trimethylierung ein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden. (Abb. 3.23).

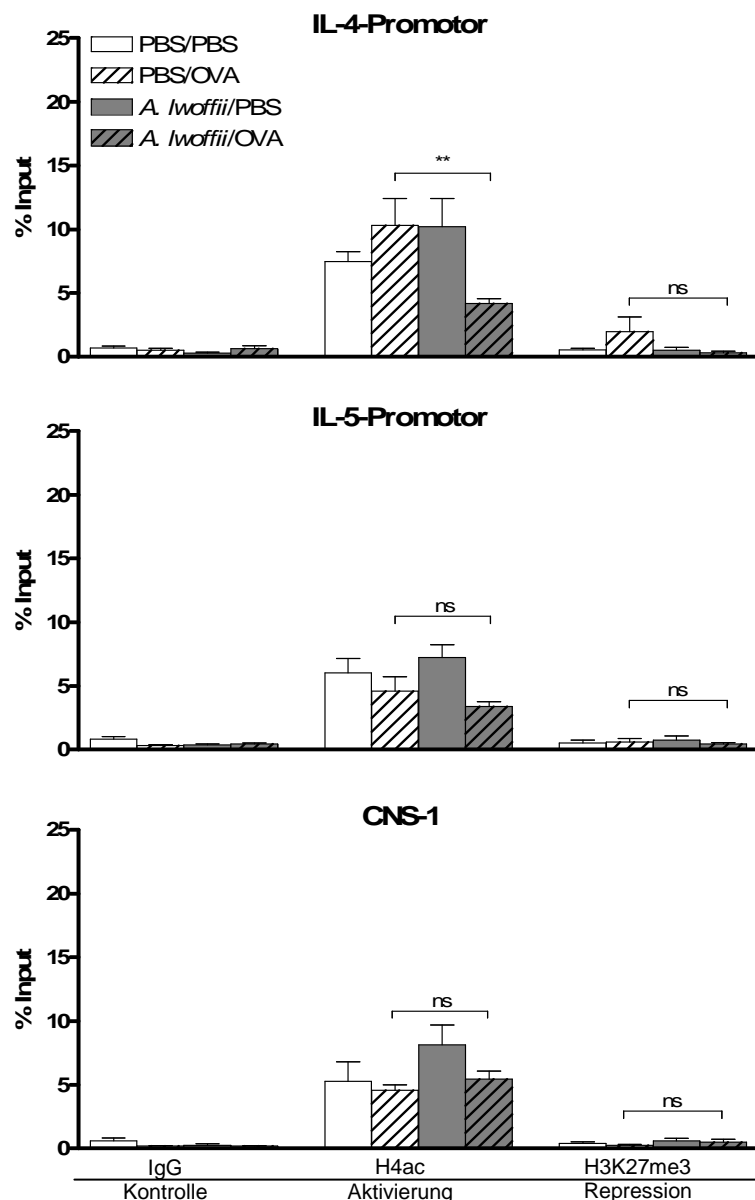


Abb. 3.23 Veränderte Histonmodifikationen am Th2-Lokus nach pränataler *A. lwoffii* F78-Exposition Weiblichen Balb/c-Mäusen wurde vor und während der Schwangerschaft *A. lwoffii* F78 (1×10^8 CFU) intranasal appliziert. Die Nachkommen dieser Mütter ($n = 4-8$ pro Gruppe) wurden mit OVA sensibilisiert und provoziert. Anschließend wurden $CD4^+CD25^-$ -T-Zellen aus der Milz dieser Tiere isoliert und die H4-Acetylierung (H4ac) sowie die H3 Lysin 27-Trimethylierung (H3K27me3) im Bereich des IL-4- und IL-5-Promotors und der CNS-1-Region mittels ChIP analysiert.

3.2.4 Inhibition der Histonacetylierung durch den Histonacetyltransferase-Inhibitor Garcinol verhindert *A. lwoffii* F78-vermittelte Asthma-Protektion in den Nachkommen

Da der stärkste Effekt einer pränatalen *A. lwoffii* F78-Exposition auf epigenetische Mechanismen bei der H4-Acetylierung am IFN γ -Promotor CD4⁺CD25⁻-T-Zellen nachzuweisen war, wurde die Rolle des erhöhten H4-Acetylierungsgrades weiter untersucht. Dazu wurde analysiert, ob die pharmakologische Inhibition der Histonacetylierung in pränatal *A. lwoffii* F78-exponierten Tieren zu einer Wiederherstellung des asthmatischen Phänotyps nach OVA-Sensibilisierung und Provokation führt. Zur Inhibition der Histonacetylierung wurde Garcinol, ein polyisoprenyliertes Benzophenon, verwandt, welches ein Inhibitor der Histonacetyltransferasen p300 und PCAF ist und damit *de novo* Acetylierung beeinflusst (Balasubramanyam 2004).

Um Nebeneffekte von Garcinol auf Immunzellen auszuschließen und um sicherzustellen, dass insbesondere die Funktionalität von T-Zellen nicht beeinflusst wird, wurden zunächst Tiere an vier aufeinanderfolgenden Tagen mit einer Dosis von 0,2mg/kg Körpergewicht intraperitoneal behandelt. Die Garcinol-Behandlung per se bewirkte keinerlei zytotoxische Nebeneffekte. Es waren weder Gewichtsverlust noch Veränderungen im Verhalten der Tiere nachweisbar und auch die Anzahl von MNCs aus der Milz zeigte sich nicht verändert (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wurden die Immunzellen in Form von MNCs aus der Milz auf ihre Aktivierbarkeit und Proliferationsfähigkeit nach Garcinol-Behandlung untersucht. Dazu wurden Tiere wiederum an vier aufeinanderfolgenden Tagen mit der entsprechenden Dosis Garcinol behandelt und 24h nach der letzten Garcinol-Gabe MNCs aus der Milz der Tiere isoliert, diese mit CFSE markiert und anschließend mit anti-CD3/anti-CD28 stimuliert. Nach 24h, 48h und 72h wurden zusätzlich CD4⁺-T-Zellen mittels eines APC-gekoppelten Antikörpers markiert und die Proliferationsfähigkeit der Zellen im Vergleich zu Zellen von PBS behandelten Tieren mit Hilfe von Durchflusszytometrie ermittelt. Hier konnte gezeigt werden, dass die Proliferationsfähigkeit und Aktivierbarkeit nach anti-CD3/anti-CD28-Stimulation sowohl von CD4⁺-T-Zellen, als auch von MNCs im allgemeinen nicht durch Garcinol beeinflusst wurde (Abb. 3.24).

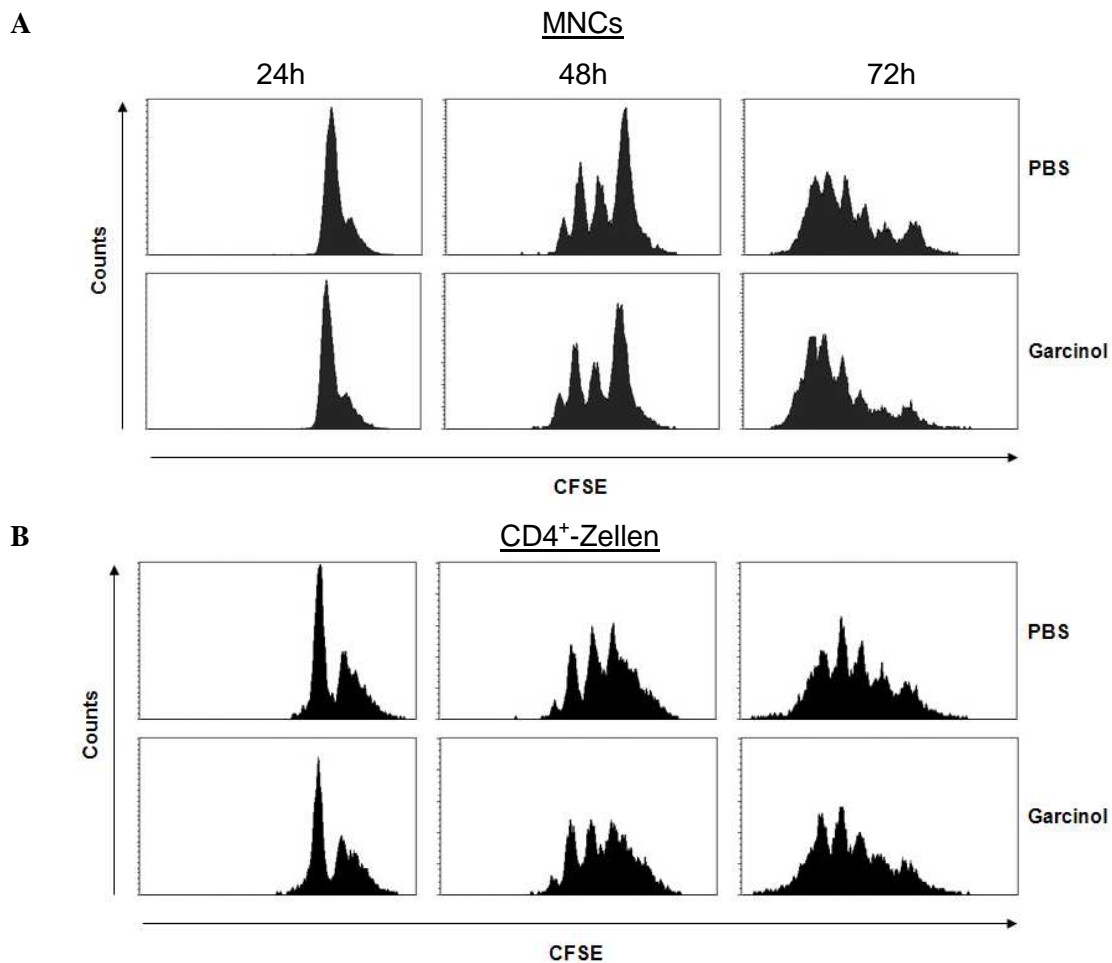


Abb. 3.24 Keine Beeinflussung der Proliferationsfähigkeit von Immunzellen nach Garcinol-Behandlung *ex vivo*

Balb/c-Mäuse (n = 4 pro Gruppe) wurden für zwei Wochen dreimal pro Woche mit 0,2 mg/kg Garcinol i.p. behandelt. Anschließend wurden MNCs aus der Milz isoliert, mit CFSE markiert und mit anti-CD3/anti-CD28 stimuliert. Nach 24h, 48h und 72h erfolgte die Bestimmung der Proliferationsfähigkeit mittels FACS sowohl von (A) MNCs als auch (B) CD4⁺-T-Zellen.

Um vollständig ausschließen zu können, dass die Garcinol-Behandlung *in vivo* zur Beeinflussung der Proliferation von Immunzellen führt, wurden weiterhin CFSE-markierte CD4⁺-T-Zellen in SCID-Mäuse transferiert, die jeden zweiten Tag mit der entsprechenden Dosis Garcinol behandelt wurden. Da diese Tiere T-Zell-defizient sind, ist dies ein Anreiz für die transferierten Zellen zu Proliferieren (Li 2007). Acht Tage nach dem Transfer erfolgte die Isolation von MNCs aus der Milz und die Bestimmung der Proliferationsfähigkeit der transferierten Zellen mittels FACS, wobei die CD4⁺-T-Zellen zusätzlichen mittels eines APC-gekoppelten anti-CD4-Antikörpers markiert wurden. Hier zeigte sich, dass auch in der *in vivo*-Situation die Garcinol-Behandlung in der verwendeten Dosis keinerlei zytostatischen Einfluss auf die T-Zellen hatte (Abb. 3.25).

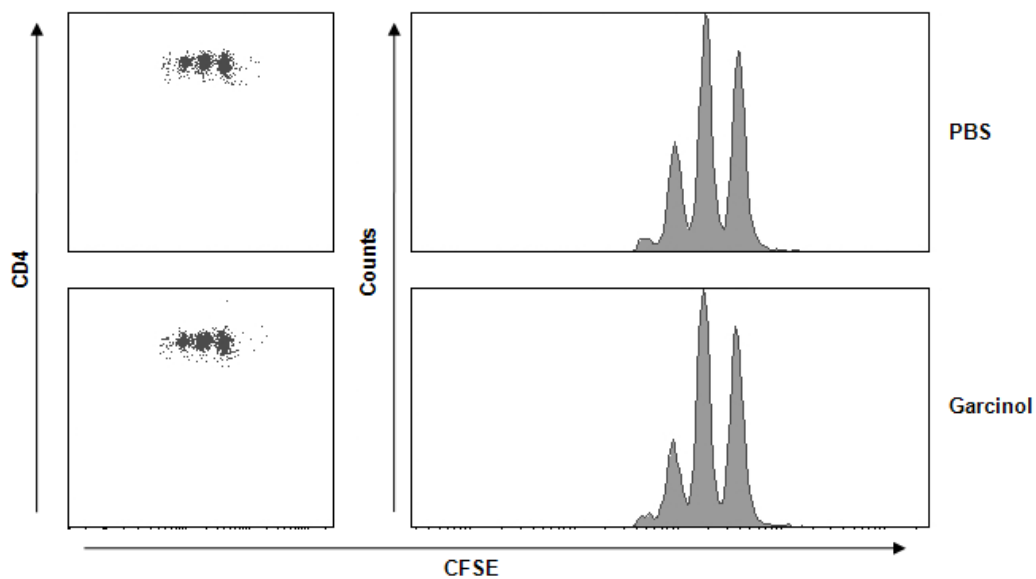


Abb. 3.25 Keine Beeinflussung der Proliferationsfähigkeit von Immunzellen nach Garcinol-Behandlung *in vivo*

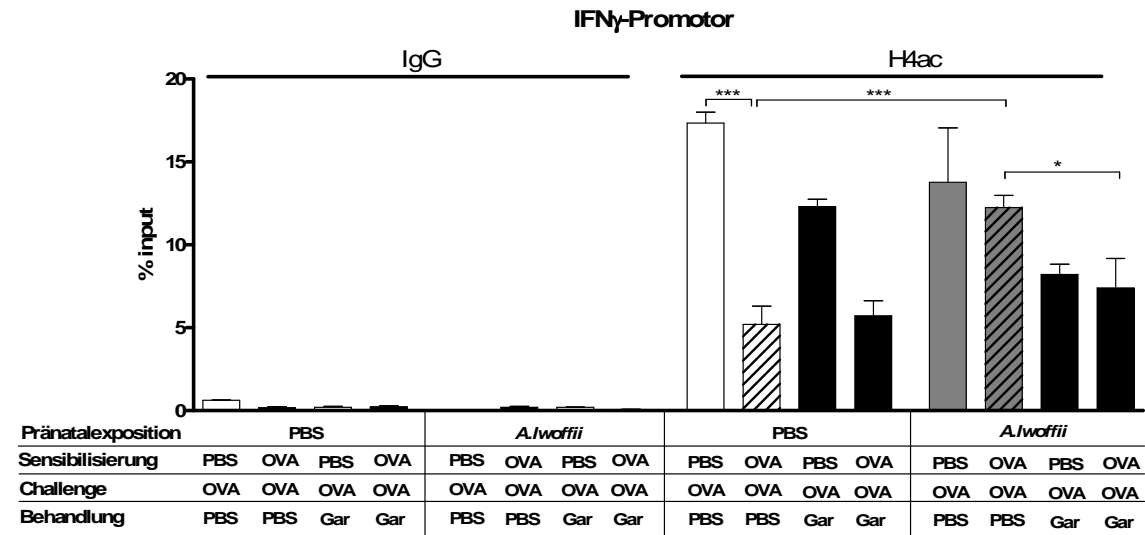
CFSE markierte CD4⁺-T-Zellen wurden SCID-Mäusen transferiert und die Mäuse anschließend alle zwei Tage mit 0,2 mg/kg Garcinol i.p. behandelt. Nach acht Tagen wurde die Proliferationsfähigkeit der transferierten Zellen mittels FACS bestimmt.

Da der Histonacetyltransferase-Inhibitor Garcinol keine zytotoxischen bzw. zytostatischen Eigenschaften auf Immunzellen aufwies, wurde er anschließend im Pränatalmodell der *A. lwoffii* F78-vermittelten Asthma-Protektion eingesetzt (Abb. 2.5). Dazu wurden Nachkommen *A. lwoffii* F78-exponierter Mütter 24h vor der ersten OVA-Provokation und an den darauffolgenden Tagen jeweils 30 Minuten vor OVA-Provokation mit der entsprechenden Dosis Garcinol i.p. behandelt und anschließend zum einen der Einfluss des Inhibitors auf die H4-Acetylierung am IFN γ -Promotor untersucht und zum anderen die Ausprägung des asthmatischen Phänotyps analysiert.

Hier konnte in Bezug auf die H4-Acetylierung im Bereich des IFN γ -Promotors gezeigt werden, dass nach Garcinol-Behandlung PBS-sensibilisierter Nachkommen PBS-exponierter Mütter während der OVA-Provokation die H4-Acetylierung am IFN γ -Promotor um ca. 5% inhibiert wurde (Abb. 3.26A). Im Gegensatz dazu wurden die bereits geringen Acetylierungsgrade bei OVA-sensibilisierten Nachkommen PBS-exponierter Mütter nicht beeinflusst. Die Garcinol-Behandlung von Nachkommen *A. lwoffii* F78-exponierter Mütter jedoch führte zu einer signifikanten Verhinderung der Acetylierung des Histons H4 am proximalen IFN γ -Promotor (Abb. 3.26A). In Bezug auf die H4-Acetylierung am IL-4-Promotor kam es zu keinem Anstieg, sondern zu einer Erniedrigung

nach pränataler *A. lwoffii* F78-Exposition und anschließender OVA-Sensibilisierung und -Provokation (Abb. 3.23), so dass Garcinol, als Inhibitor von *de novo*-Acetylierung, hier keinen Einfluss haben sollte. Daher wurde als Kontrolle zusätzlich die H4-Acetylierung der Histone dieser Genregion bestimmt, wobei sich bestätigte, dass keine signifikanten Veränderungen der H4-Acetylierung vorhanden waren (Abb. 3.26B).

A



B

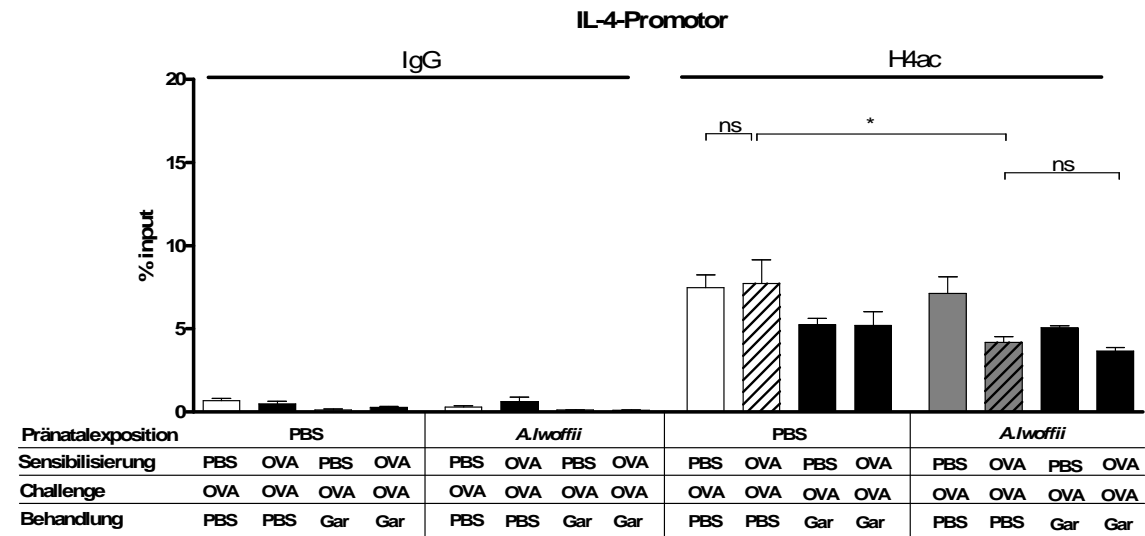


Abb. 3.26 Garcinol inhibiert erhöhte H4-Acetylierung am IFN γ -Promotor nach pränataler *A. lwoffii* F78-Exposition

Weiblichen Balb/c-Mäusen wurde vor und während der Schwangerschaft *A. lwoffii* F78 (1×10^8 CFU) intranasal appliziert. Die Nachkommen dieser Mütter ($n = 4-8$ pro Gruppe) wurden mit OVA sensibilisiert und provoziert und ein Teil der Tiere mit dem Histonacetyltransferase-Inhibitor Garcinol (0,2 mg/kg) i.p. behandelt. Anschließend wurden CD4⁺CD25⁻-T-Zellen aus der Milz dieser Tiere isoliert und die H4-Acetylierung (H4ac) am (A) IFN γ -Promotor und der (B) IL-4-Region mittels ChIP analysiert. Gar = Garcinol.

Die erniedrigte H4-Acetylierung am IFN γ -Promotor nach Garcinol-Behandlung korrelierte mit einer verringerten IFN γ -Produktion durch MNCs aus der Milz der behandelten Tiere nach anti-CD3/anti-CD28-Stimulation. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass als Folge der verminderten IFN γ -Produktion, erhöhte IL-5-Konzentrationen im Überstand von MNCs nachweisbar waren (Abb. 3.27).

In Bezug auf die Ausprägung experimentellen Asthmas bei Nachkommen *A. lwoffii* F78-exponierter Mütter nach Garcinol-Gabe zeigte sich eine komplette Aufhebung der Asthma-Protektion einhergehend mit einer Wiederherstellung des asthmatischen Phänotyps. So war eine deutliche Infiltration des Lungengewebes mit Entzündungszellen insbesondere ein signifikanter Einstrom von eosinophilen Granulozyten in das Atemwegslumen nachzuweisen. Weiterhin kam es zu einer Wiederherstellung der Atemwegshyperreaktivität nach Provokation mit Methacholin, so dass insgesamt ein Phänotyp vergleichbar zur pränatal PBS-exponierten OVA-Kontrollgruppe zu verzeichnen war (Abb. 3.28).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass pränatale Exposition mit dem Bakterium *A. lwoffii* F78 zu epigenetischen Veränderungen führt, insbesondere in Bezug auf Histon H4-Acetylierung der Th1- und Th2-Loci, und dass diese Veränderung eine wichtige Rolle bei der mikrobiell vermittelten Asthma-Protektion spielt.

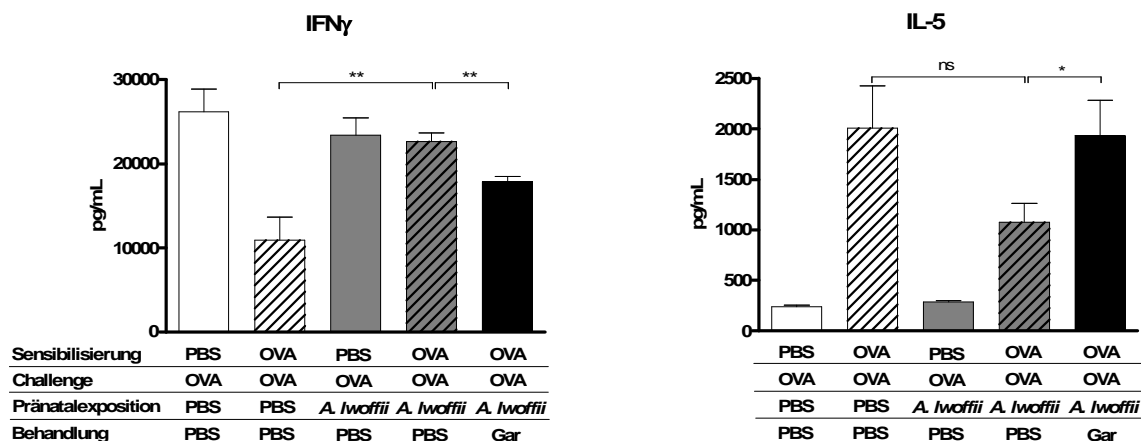


Abb. 3.27 Erniedrigte IFN γ - und erhöhte IL-5-Produktion nach Garcinol-Behandlung von pränatal *A. lwoffii* F78-exponierten Mäusen

Weiblichen Balb/c-Mäusen wurde vor und während der Schwangerschaft *A. lwoffii* F78 (1×10^8 CFU) intranasal appliziert. Die Nachkommen dieser Mütter ($n = 4-8$ pro Gruppe) wurden mit OVA sensibilisiert und provoziert und ein Teil der Tiere mit dem Histonacetyltransferase-Inhibitor Garcinol (0,2 mg/kg) i.p. behandelt. MNCs wurden aus der Milz isoliert, mit anti-CD3/anti-CD28 stimuliert und die IFN γ - und IL-5-Produktion im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Gar = Garcinol.

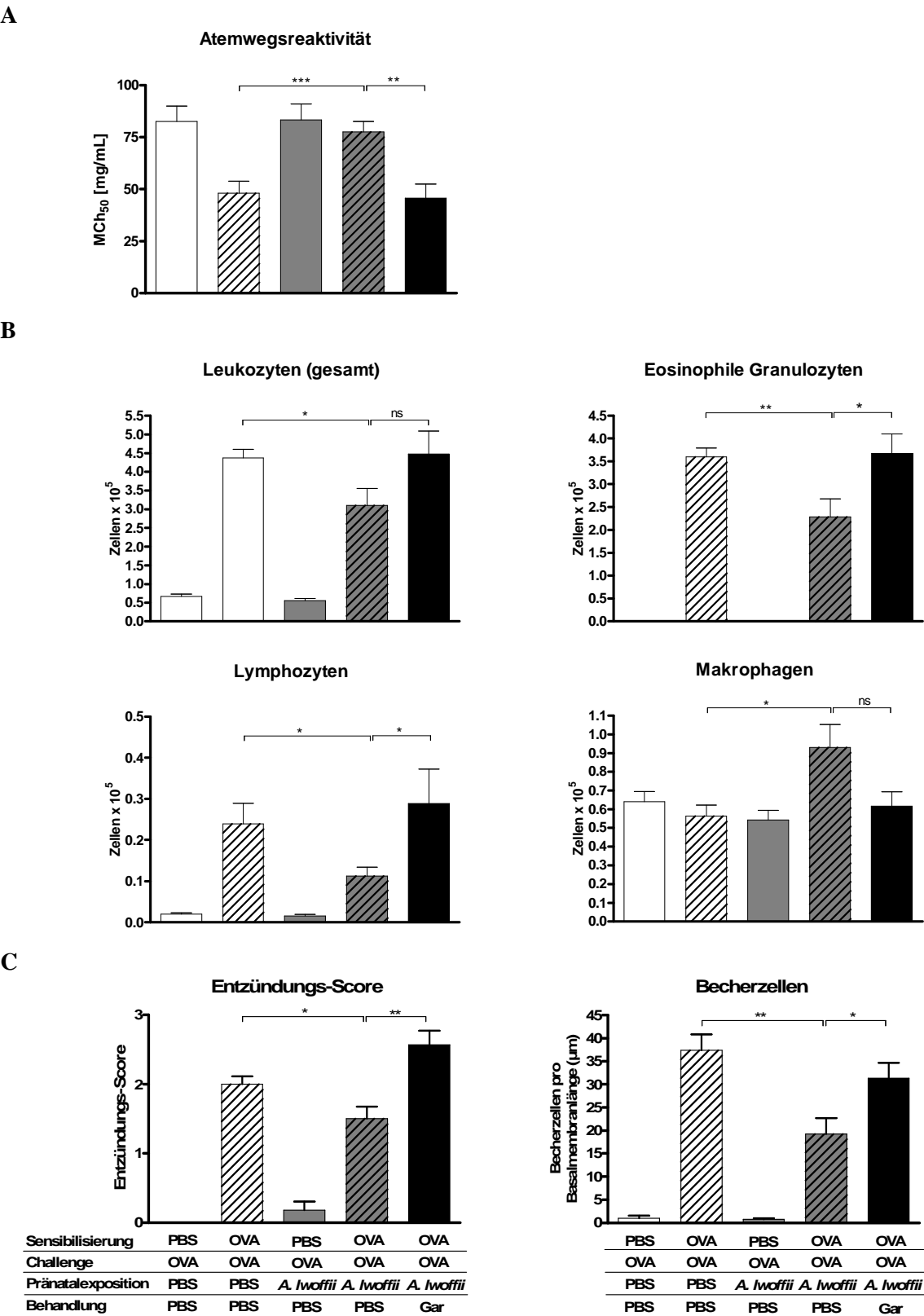


Abb. 3.28 Der Histon-Acetyltransferase-Inhibitor Garcinol führt zur Wiederherstellung des asthmatischen Phänotyps

Weiblichen Balb/c-Mäusen wurde vor und während der Schwangerschaft *A. Iwoffii* F78 (1×10^8 CFU) intranasal appliziert. Die Nachkommen dieser Mütter ($n = 4-8$ pro Gruppe) wurden mit OVA sensibilisiert und provoziert und ein Teil der Tiere mit dem Histon-Acetyltransferase-Inhibitor Garcinol (0,2 mg/kg) i.p. behandelt. (A) 24h nach der letzten OVA-Provokation erfolgte die Analyse der Atemwegsreaktivität. (B). Differenzierung der Leukozyten in der BAL-Flüssigkeit. (C) Quantifizierung der Inflammation und des Anteils Mukus-produzierender Becherzellen in den Atemwegen der Nachkommen. Gar = Garcinol

4 DISKUSSION

Chronisch-entzündliche Erkrankungen sind komplexe Erkrankungen, die sich in ganz unterschiedlichen Phänotypen manifestieren können, und die aus der Interaktion zwischen genetischer Disposition und Umweltexposition resultieren (von Mutius 2009). Eine alleinige genetische Disposition ist häufig nicht ausreichend, um die Erkrankungen zum Ausbruch zu bringen. Der zusätzliche Einfluss entsprechender Umweltfaktoren ist nötig, die im Zusammenspiel mit der Genetik über die Entstehung und Ausprägung des jeweiligen klinischen Phänotyps entscheiden. Über solche Gen-Umwelt-Interaktionen können verschiedenste Umweltfaktoren z.B. aus der Ernährung oder dem mikrobiellen Milieu auf das jeweilige Genrepertoire einwirken und so die Expression von Genen zulassen oder unterbinden. Die molekularen Mechanismen, die hinter der Modulation der Genexpression durch Umweltfaktoren stehen, sind jedoch häufig noch unklar. In diesem Zusammenhang wurde epigenetische Regulation, vermittelt durch die Mechanismen der DNA-Methylierung und Histonmodifikation, in den letzten Jahren als ein neuer Mechanismus identifiziert, um die Wirkung von Umweltfaktoren bzw. Umwelteinflüssen bei der Entwicklung einer Vielzahl komplexer Erkrankungen zu erklären (Jirtle 2007, van der Maarel 2008). Am Besten untersucht sind diese Mechanismen für Krebserkrankungen. Eine der ersten epigenetischen Veränderungen die diesbezüglich entdeckt wurden war, dass Tumorzellen eine veränderte DNA-Methylierung im Vergleich zu Zellen aus gesundem Gewebe aufwiesen (Urdinguio 2009). Dieses Konzept der epigenetischen Regulation wurde auf bestimmte Erkrankungen des Immunsystems wie z.B. Autoimmunerkrankungen, aber auch Allergien und damit einbezogen allergisches Asthma bronchiale übertragen (Hewagama 2009, Martino 2010). So wurde z.B. festgestellt, dass DNA-Hypomethylierung in T-Zellen mit dem Grad der Erkrankung bei Rheumatoider Arthritis und Systemischem Lupus Erythematosus korreliert (Pan 2009). Auch auf zellulärer Ebene ist die Reifung/Differenzierung verschiedener T-Zell-Subpopulationen, einschließlich Th1-, Th2-, Th17- und regulatorischer T-Zellen, durch Veränderung epigenetischer Modifikationen beeinflusst (Hühn 2009, Jones 2006, Wilson 2009). Dennoch ist immer noch nicht geklärt, wie die Veränderung epigenetischer Regulation zu funktionellen Konsequenzen auf die T-Zell-Differenzierung und damit nachfolgend auf die Entwicklung von Allergie und Asthma im Tiermodell führt.

In diesem Zusammenhang wurden erste in vivo Experimente von Hollingsworth und Kollegen (2008) und Liu und Kollegen (2008) durchgeführt. Erstere konnten zeigen, dass

eine maternale methylendonorreiche Ernährung zu Veränderungen im DNA-Methylierungsgrad an verschiedenen Genloci im Lungengewebe der Nachkommen führte. Diese Veränderung war assoziiert mit einer Verschlechterung des asthmatischen Phänotyps in den Tieren und spielt damit evtl. eine Rolle bei der Entwicklung einer experimentellen allergischen Atemwegsentzündung. Letztere zeigten, dass eine Exposition mit Diesel-Partikeln, die parallel zu einer *Aspergillus fumigatus*-Sensibilisierung durchgeführt wurde, zu einer Veränderung der DNA-Methylierung am IFN γ - und IL-4-Promotor in CD4⁺-T-Zellen aus der Milz führte, die wiederum mit der Produktion der Th1- und Th2-assoziierten Antikörper korrelierte. Diese Studien liefern somit erste Hinweise, dass epigenetische Regulation in Form von DNA-Methylierung die Entwicklung und Ausprägung experimentellen Asthmas beeinflussen könnte. Hier kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass bedingt durch die Vielzahl an möglichen biochemischen Reaktionen und „Pathways“ des komplexen Methyl-Metabolismus weitere Mechanismen essentiell beteiligt sind. Die indirekte Beeinflussung durch Experimente mit methylendonorreicher Kost bzw. Exposition mit Diesel-Partikeln spiegelt daher evtl. nicht nur epigenetische Mechanismen wieder.

Neben Daten zur DNA-Methylierung gibt es auch erste *in vivo*-Versuche in Bezug auf Histonmodifikationen und Asthma im Tiermodell. So konnte von Choi und Kollegen (2005) gezeigt werden, dass die Behandlung von Mäusen während der Sensibilisierungsphase mit den HDAC-Inhibitor Trichostatin A (TSA) zu einer Unterdrückung des asthmatischen Phänotyps führte. Neben DNA-Methylierung können daher auch Histonmodifikationen die Ausprägung von experimentellem Asthma beeinflussen.

Diese ersten Daten in Bezug auf die Assoziation von Allergie/Asthma und Epigenetik führten hier zu der Hypothese, dass Einflüsse verschiedener Umweltfaktoren zur Beeinflussung epigenetischer Mechanismen in Immunzellen führen können, und dass so eine veränderte epigenetische Modulation dann wiederum zur Initiation der allergischen Sensibilisierung und der Entwicklung eines asthmatischen Phänotyps beiträgt oder davor schützen kann.

Aus dieser Annahme leiteten sich wiederum die folgenden Fragestellungen dieser Arbeit ab. So sollte hier...

- (1) die Auswirkung einer direkten Veränderung der DNA-Methylierung auf die Ausprägung des asthmatischen Phänotyps im Tiermodell des experimentellen Asthmas untersucht werden und
- (2) analysiert werden, inwiefern eine Veränderung des asthmatischen Phänotyps, die induziert ist durch pränatale Umwelteinflüsse in Form mikrobieller Stimuli, durch Modulation epigenetischer Mechanismen verursacht ist.

4.1 Inhibition der DNA-Methylierung beeinflusst allergische Sensibilisierung und Phänotyp im Tiermodell des experimentellen Asthmas

Zur Analyse, ob epigenetische Regulation in Form von DNA-Methylierung bei der Entwicklung von experimentellem Asthma im Tiermodell eine zentrale Rolle spielt, wurde die Möglichkeit genutzt, mittels eines potenten DNA-Methyltransferase-Inhibitors (5-Aza-2'-Deoxycytidin (5Aza)) die DNA-Methylierung direkt beeinflussen zu können (Egger 2004). Dies sollte im Vergleich zur indirekten Beeinflussung durch exogene Faktoren zuverlässigere Ergebnisse liefern in Bezug auf den Beitrag epigenetischer Regulation in Form von DNA-Methylierung bei der Entwicklung von allergischen Asthma.

Ein DNA-Methyltransferase-Inhibitor liefert ein experimentelles Werkzeug, mit dem Modifikationen epigenetischer Signaturen auf dem DNA-Methylierungsniveau unter kontrollierten Bedingungen induziert werden können, da Nukleinsäuren das alleinige Ziel dieses Reagenz darstellen. Die Anwendung im Tiermodell erlaubt die Induktion einer DNA-Methylierungsänderung zu spezifischen Zeitpunkten während der Asthmaentwicklung. Da hier untersucht werden sollte, ob eine veränderte epigenetische Ausgangssituation die Entwicklung von Atopie und allergischem Asthma beeinflussen kann, wurden Tiere in einem gut etablierten Mausmodell des experimentellen Asthmas vor und während der Sensibilisierung mit 5Aza behandelt (Abb. 2.2). Hierdurch sollte eine veränderte epigenetische Signatur als „Ausgangssituation“ geschaffen werden und diese Veränderung durch die kontinuierliche Weiterbehandlung aufrechterhalten werden.

5-Aza-2'-Deoxycytidin ist ein Nukleosidanalogue des Cytidins, welches während der Replikation in die DNA inkorporiert wird (Palii 2008, Christman 2002, Stresemann 2006). Infolge dessen kommt es durch kovalente Bindung an 5Aza zur Inhibition von DNA-Methyltransferasen (DNMT), was im Verlauf der Zellteilung in sog. passiver globaler Demethylierung resultiert (Egger 2004, Cheng 2004, Weisenberger 2004).

Im Zusammenhang mit verschiedenen Krebserkrankungen konnte eine Verknüpfung zwischen DNA-Methylierung und Erkrankung mittels 5Aza bereits belegt werden. So wurde ein präventiver Effekt der 5Aza-Behandlung in einem Chemikalien-induzierten Lungentumor-Modell der Maus nachgewiesen (Lantry 1999). Weiterhin konnte z.B. gezeigt werden, dass der TSC (TGF- β stimulated clone)-22 Promotor bei Mäusen mit T- oder NK-Zell „Large Granular Leukemia“ (LGL) methyliert vorliegt, was assoziiert ist mit einer stillgelegten TSC-22-Expression. Diese Deregulation konnte *in vivo* mittels 5Aza aufgehoben werden, was die Lebensdauer der Mäuse signifikant erhöhte (Yu 2009). Aber auch in der humanen Leukämie-Therapie wird 5Aza schon seit den 1980er Jahren mit Erfolg angewandt (Hackanson 2005, Issa 2005, Yang 2006, Sigalotti 2007). Sowohl in den Mausmodellen, als auch bei der humanen Behandlung wird der therapeutische Erfolg darauf zurückgeführt, dass 5Aza zur Re-Expression von Tumorsuppressor-Genen führt (Caceres 2006), aber auch dosisabhängig zytostatische bzw. zytotoxische Funktionen ausüben kann, was zur Hemmung des Wachstums von Tumorzellen führt (Juttermann 2004, Michalowsky 1987).

Für die Behandlung von Tieren im Modell des experimentellen Asthmas war es von Bedeutung, eine Applikationskonzentration zu finden, die bei kontinuierlicher Behandlung keinerlei zytostatische bzw. zytotoxische Eigenschaften, besonders auf Immunzellen, aufwies. Ausgehend von Erfahrungen aus einem Lungentumor-Modell in der Maus, bei dem bereits eine Langzeitgabe von 5Aza beschrieben war (Lantry 1999), wurden daher Mäuse dreimal pro Woche über drei Wochen mit drei verschiedenen 5Aza-Konzentrationen (1, 0,5 und 0,2 mg/kg Körpergewicht) behandelt. Im Gegensatz zu der bei Lantry und Kollegen beschriebenen gut vertragenen Konzentration von 1 mg/kg, erwies sich diese Menge hier als letale Dosis und auch bei 0,5 mg/kg zeigten die Tiere deutliche Anzeichen toxischer Effekte. Nur die Dosis von 0,2 mg/kg wurde gut vertragen und es kam zu keinerlei detektierbarem Einfluss auf die behandelten Tiere sowohl hinsichtlich des Phänotyps (Gewicht, Fell, Verhalten), als auch auf zellulärer Ebene (Leukozytendifferenzierung aus dem Blut, *ex vivo* und *in vivo* Proliferation von CD4⁺-T-Zellen). Neben einer guten Verträglichkeit sollte die Behandlung mit 5Aza, trotz der relativ geringen Dosis, weiterhin einen Effekt auf den genomweiten Methylierungsgrad ausüben. Zur Untersuchung, ob 5Aza in der nicht toxischen Dosis diese erwartete Wirkung hatte, wurde die genomweite Methylierung mittels LUMA zu unterschiedlichen Zeitpunkten des experimentellen Protokolls untersucht, wobei eine erfolgreiche

Demethylierung verifiziert werden konnte. Daher wurde die Dosis von 0,2 mg/kg Körpergewicht für die folgenden Versuche im Tiermodell des experimentellen Asthmas eingesetzt, da hier ein Einfluss auf die DNA-Methylierung vorhanden war, aber ausgeschlossen werden konnte, dass Effekte auf den asthmatischen Phänotyp bedingt waren durch zytostatische Eigenschaften.

4.1.1 Systemische 5Aza-Behandlung reduziert den asthmatischen Phänotyp im Tiermodell

Zur Ermittlung des Einflusses der 5Aza-Behandlung auf experimentelles Asthma wurden Mäuse zunächst systemisch vor und während der Sensibilisierung mit dem DNMT-Inhibitor behandelt und anschließend der asthmatische Phänotyp charakterisiert. Die 5Aza-Behandlung resultierte hier in einem nahezu aufgehobenem asthmatischen Phänotyp einhergehend mit einer veränderten Th1/Th2-Balance. So zeigte sich eine erhöhte IFN γ -Produktion durch MNCs der Milz nach Stimulation, die Produktion der Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 war dagegen erniedrigt. Gleiches zeigte sich auch auf mRNA-Ebene, mit Ausnahme von IL-4, dessen mRNA-Expression hier nicht verändert war. Weiterhin beeinflussten die Veränderungen in der Th1/Th2-Zytokin-Produktion, neben der T-Zell-Effektor-Antwort, den Immunglobulin „Isotype-Switch“ in B-Zellen. Im Tiermodell des experimentellen Asthmas führt die Sensibilisierung mit OVA bekanntermaßen zu hohen anti-OVA-IgE- und IgG1-Titern und im Gegensatz dazu zu niedrigen IgG2a-Spiegeln (Geha 2003, Barnes 2008, Coffman 1989). In Folge von 5Aza-Behandlung kam es jedoch zu einer signifikanten Reduktion der Th2-assoziierten IgE- und IgG1-Antikörper und der Th1-assoziierte IgG2a-Antikörper-Spiegel war erhöht.

Diese Daten weisen darauf hin, dass das Vorkommen oder die Verhinderung einer allergischen Sensibilisierung von etablierten epigenetischen Signaturen der Zellen abhängt, die in den Sensibilisierungsprozess verwickelt sind. Als Konsequenz zeigen Tiere, die mit 5Aza behandelt worden sind, kaum Anzeichen eines experimentellen Asthmas. Da nach 5Aza-Behandlung die Parameter der T-Helfer-Zell-abhängigen Immunantwort in Th1-Richtung verändert waren, führte hier zu der Frage, ob eine veränderte T-Zell-Reaktion von zentraler Bedeutung ist und ob hier eine veränderte epigenetische Regulation/Signatur eine Rolle spielt.

4.1.2 Differenzielle Demethylierung nach 5Aza-Behandlung

In Bezug auf epigenetische Regulation wurden sowohl für den Th1- (IFN γ), als auch für den Th2-Zytokin-Lokus (IL-4-, IL-5-, IL-13-Genregion) bereits detaillierte Untersuchungen über Veränderungen des DNA-Methylierungsmusters in sich differenzierenden CD4⁺-T-Zellen durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass in murinen naiven CD4⁺-T-Zellen der IFN γ -Promotor zu einem großen Anteil demethyliert vorliegt und nach Aktivierung unter Th1-polarisierenden Konditionen so verbleibt. Unter Th2-polarisierenden Konditionen jedoch kommt es zur DNA-Methylierung im Verlauf der Repression der IFN γ -Produktion (Jones 2006, Winders 2004, Young 1994, Chang 2007, Schoenborn 2007). Im Gegensatz dazu ist der Th2-Lokus in naiven T-Zellen zu einem hohen Grad methyliert und verbleibt so unter Th1-polarisierenden Konditionen. Nur im Verlauf der Differenzierung zur Th2-Zelle werden die genregulatorischen Regionen des Th2-Lokus progressiv demethyliert, was die Produktion der Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 begünstigt (Agarwal 1998, Bird 1998, Lee 2002, Kim 2007).

Dass die Kapazität von T-Zellen IFN γ zu produzieren, korreliert mit einer Hypermethylierung und einer offenen Chromatinstruktur des IFN γ -Gens, konnte bereits in zahlreichen Studien gezeigt werden (Agarwal 1998, Fitzpatrick 1998, 1999, Melvin 1995, Young 1994, Schoenborn 2007, Jones 2006). Ähnliche Korrelationen wurden für IL-4, IL-5 und IL-13 gefunden (Agarwal 1998, 2000, Bird 1998, Lee 2000, Ouyang 2000, Rose 2007, Loots 2000, Lee 2005). Der regulatorische Effekt von DNA-Methylierung auf die Zytokinexpression wird unterstützt durch die Beobachtung, dass der DNMT-Inhibitor 5Aza sowohl die Expression von IFN γ , als auch von IL-4 *in vitro* in kultivierten T-Zellen erhöht, wobei sich der Einfluss auf IFN γ ausgeprägter darstellte (Bird 1998). In Übereinstimmung damit konnte weiterhin gezeigt werden, dass die T-Zell-spezifische Deletion von DNMT1 zu einer globalen genomischen DNA-Hypermethylierung einhergehend mit einer erhöhten T-Zell-Zytokin-Expression führt, wobei auch hier IFN γ stärker beeinflusst war als IL-4 (Lee 2001). Diese Daten unterstützen die Rolle von DNA-Methylierung bei der Regulation der Zytokin-Expression in T-Zellen und den möglicherweise bevorzugten Einfluss auf die epigenetische Regulation der IFN γ -Genaktivität.

Da nach 5Aza-Behandlung die Th1/Th2-Balance in Th1-Richtung verschoben war und Th1- und Th2-Effektor-Zellpopulationen eine zentrale Rolle bei der Dirigierung des asthmatischen Phänotyps spielen (Iwamoto 1993, Li 1996, Coyle 1996, Foster 1996,

Wills-Karp 1998, Barnes 2008), wurde neben dem genomweiten Methylierungsgrad weiterhin der genspezifische Methylierungsgrad von Th1- und Th2-spezifischen Genloci (IFN γ -, IL-4-, IL-5-Promotor und CNS-1-Region) von MNCs aus der Milz analysiert, um zu untersuchen, ob Gene, die bei der Etablierung einer allergischen Immunantwort eine Rolle spielen, durch das Reagenz 5Aza (unterschiedlich) beeinflusst werden. Hier zeigte sich sowohl für die Methylierung der einzelnen CpG-Motive, als auch für die durchschnittliche mittlere Methylierung, eine signifikant stärkere Demethylierung am IFN γ -Promotor im Vergleich zum IL-4- und IL-5-Promotor und zur Th2-regulatorischen CNS-1-Region OVA-sensibilisierter Tiere, welche durch die 5Aza-Behandlung kaum beeinflusst war. Diese Daten weisen darauf hin, dass die Behandlung mit 5Aza evtl. konzentrationsabhängig zu selektiven Demethylierungsvorgängen während der Replikation von Zellen führt. Das Phänomen der begrenzten DNA-Demethylierung durch 5Aza wurde in *in vitro* Versuchen bereits ähnlich von Polansky und Kollegen (2008) beobachtet und deutet ebenfalls auf einen doch eher selektiven, als generellen Einfluss von 5Aza hin.

Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass es durch die Behandlung der Tiere mit einer sehr geringen Konzentration an 5Aza „nur“ zu einer Erniedrigung der Konzentration an aktiven DNMTs in den Zellen kommt. Eine komplette Inhibition/Abwesenheit von aktiven DNMTs würde zu einer eingeschränkten Proliferationsfähigkeit der Zellen und damit zu toxischen Effekten führen (Lee 2001). Solche Effekte konnten jedoch sowohl durch *in vitro* und *in vivo* Proliferationsassays, als auch durch das Überleben der Tiere in gesundem Zustand ausgeschlossen werden. Hier könnte spekuliert werden, dass es bei geringer DNMT-Konzentration eine Art Rangordnung gibt, die bestimmt, an welchen Genen DNMTs vorrangig zum Einsatz kommen, um das Überleben und die Vermehrung von Zellen zu sichern. Hier wäre sinnvoll, dass Gene bevorzugt werden, die für Proteine des Zellzyklus kodieren. Dies bleibt allerdings eine Mutmaßung, da bisher nur wenig darüber bekannt ist, wie DNMTs reguliert werden.

Die eher selektive Demethylierung könnte aber auch dadurch bedingt sein, dass 5Aza möglicherweise sequenzspezifisch oder strukturspezifisch an bestimmten Stellen der DNA bevorzugt anstelle von Cytosin eingebaut wird, wodurch bei Replikation DNMTs an dieser Stelle inhibiert werden und das Methylierungsmuster nicht vom Mutter- auf den Tochterstrang übertragen wird.

Weiterhin könnte aufgrund der in dieser Arbeit generierten Daten in Bezug auf DNA-Methylierung und Zytokinexpression, und den bereits bekannten DNA-Methylierungs-

Veränderungen während der regulären T-Helfer-Zell-Differenzierung auch spekuliert werden, dass die Behandlung mit 5Aza im Verlauf der Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th2-Zellen die DNA-Methylierung am IFN γ -Lokus durch Inhibition von DNMT1 verhinderte und in Folge die hohe IFN γ -Produktion und damit die Th1/Th2-Balance erhalten blieb. Eine Verschiebung der Balance in Th2-Richtung blieb somit aus, was dazu führte, dass es nicht zur Ausprägung von experimentellem Asthma in den Tieren kam. MNCs von Tieren mit asthmatischem Phänotyp zeigten am IFN γ -Promotor eine erhöhte DNA-Methylierung im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren. Nach 5Aza-Behandlung zeigte sich hier jedoch eine erniedrigte DNA-Methylierung nach OVA-Sensibilisierung und -Provokation. An der Th2-regulatorischen CNS-1-Region zeigte sich das gegenteilige Bild zum IFN γ -Promotor, hier kam es zu einer Erniedrigung der DNA-Methylierung bei asthmatischem Phänotyp, die auch nach 5Aza-Behandlung nicht verändert war. Dass der Einfluss von 5Aza auf den Th2-Lokus, hier repräsentiert durch CNS-1, eher gering ausfiel, könnte daran liegen, dass es an diesem Lokus im Verlauf der Th2-Differenzierung per se zur DNA-Demethylierung kommt und dieser Prozess durch 5Aza nicht beeinflusst werden kann. Dies bleibt jedoch spekulativ und ist in weiteren Versuchen zur Aufklärung des Mechanismus der epigenetischen Regulation in T-Zellen zu untersuchen.

Das Ergebnis der unterschiedlichen Gen-Demethylierung der Th1- und Th2-Loci in Verbindung mit dem entsprechend veränderten Phänotyp unterstützt allerdings stark die Idee einer epigenetischen Regulation in T-Zellen während der Entwicklung einer allergischen Atemwegsentzündung.

4.1.3 Epigenetische Signatur von T-Zellen ist essentiell für Sensibilisierung und Phänotyp des experimentellen Asthmas

Insgesamt stellt es eine schwierige Herausforderung dar, aus einer systemischen Inhibition der DNA-Methylierung Schlussfolgerungen auf einen spezifischen Mechanismus zu ziehen, da eine potentielle Rolle weiterer, indirekter Effekte nicht auszuschließen ist. Einerseits ist nicht nur eine Zell- oder Gewebeart von der 5Aza-Behandlung der Mäuse betroffen. Auf der anderen Seite könnte eine Reihe von Faktoren zusätzlich zu Th1- und Th2-Zytokinen, deren Expression ebenfalls durch epigenetische Mechanismen reguliert wird, induziert (oder supprimiert) werden und dadurch ebenfalls den asthmatischen Phänotyp beeinflussen. Da in dem hier eingesetzten Tiermodell nach systemischer

Behandlung mit 5Aza Effekte auch auf Ebene der Immunglobuline nachzuweisen waren, ist dies ein Hinweis darauf, dass bereits der Sensibilisierungsprozess gegenüber OVA beeinflusst wurde. Bei der allergischen Sensibilisierung spielen T-Helfer-Zellen eine wichtige Rolle (Galli 2008, Cohn 2004), daher wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die asthmapräventiven Effekte, die durch die 5Aza-Behandlung erreicht wurden, in der Tat abhängig sind von Methylierungsänderungen in CD4⁺-T-Zellen. Dazu wurden T-Zell-Transfer-Experimente durchgeführt, bei denen CD4⁺-T-Zellen 5Aza-behandelter Tiere in naive Mäuse transferiert wurden, um zu analysieren, ob diese Zellen dann in der Lage sind, nach OVA-Provokation einen asthmatischen Phänotyp zu induzieren. Ein erfolgreicher Transfer der CD4⁺-T-Zellen wurde hier mittels FACS-Analyse verifiziert. In Übereinstimmung mit Daten aus vorhandener Literatur (Özdemir 2007, Wise 1999) führte der adoptive Transfer von aktivierten allergenspezifischen CD4⁺-T-Zellen zur Etablierung eines (abgeschwächten) asthmatischen Phänotyps in den Empfängertieren. Im Gegensatz dazu war der Phänotyp nach Transfer von Zellen 5Aza-behandelter Tiere, wie auch bei der systemischen Behandlung, kaum vorhanden und ging einher mit einer erhöhten IFN γ -Produktion und einer erniedrigten IL-4-, IL-5- und IL-13-Produktion durch MNCs der lungendrainierenden LK.

Diese durch den Transfer von CD4⁺-T-Zellen 5Aza-behandelter Mäuse erreichte Prävention der Entwicklung eines asthmatischen Phänotyps demonstriert, dass eine veränderte epigenetische Signatur in CD4⁺-T-Zellen eine bedeutende Rolle spielt bei der Sensibilisierung gegenüber einem Allergen und bei der Etablierung allergischen Asthmas.

4.1.4 Fazit

Zusammengenommen scheint epigenetische Regulation ein wichtiger Modulator für die Empfindlichkeit/Anfälligkeit zu sein, allergische Erkrankungen zu entwickeln. So haben vorhergehende Studien bereits gezeigt, dass eine veränderte Methylierung die Differenzierung von T-Helfer-Zellen *in vitro* beeinflusst bzw. dass T-Helfer-Zell-Differenzierung mit Veränderungen von DNA-Methylierung im Bereich der Th1/Th2-Zytokinloci einhergeht (Ansel 2003, Ansel 2006, Janson 2009, Wilson 2009). In diesem Zusammenhang könnte die frühe Programmierung des T-Zell-Repertoires über Modulation von DNA-Methylierung durch die Freisetzung der entsprechenden Zytokine die Richtung vorgeben, ob Sensibilisierung gegen ein Allergen stattfindet oder nicht. Zur Untersuchung dieser Fragestellung sollte der experimentelle Ansatz mittels eines DNA-Methyltransferase-Inhibitors zum „Proof-of-Concept“ hier zuverlässige Ergebnisse liefern

in Bezug auf den Beitrag epigenetischer Regulation in Form von DNA-Methylierung bei der Entwicklung von allergischen Asthma.

Diese Arbeit liefert jetzt zum ersten Mal Daten darüber, dass die niedrigdosierte Langzeitbehandlung von Tieren vor und während der Sensibilisierung mit dem DNMT-Inhibitor 5Aza, der allein die DNA-Methylierung beeinflusst (Egger 2004), zu einer pharmakologischen DNA-Demethylierung in proliferierenden Immunzellen, inklusive T-Zellen, führt und mit einer Asthma-Prävention bedingt durch eine veränderte Sensibilisierung gegenüber dem Allergen einhergeht. Bei Übertragung der Nomenklatur aus der Krebsforschung in dieses Modell liegt der Grund hierfür in einer „Re“-Expression von IFN γ , womit trotz allergischer Sensibilisierung die Th1/Th2-Balance erhalten blieb. Somit wird die hier eingangs aufgestellte Hypothese unterstützt, dass eine veränderte epigenetische Signatur/Ausgangssituation eine entscheidende Bedeutung bei der Sensibilisierung gegenüber einem Allergen, sowie bei der Etablierung des asthmatischen Phänotyps hat. Dabei spielt insbesondere die DNA-Methylierung in CD4⁺-T-Zellen, als einer der Hauptproduzenten von IFN γ und als Dirigenten der Sensibilisierung eine Rolle, wie mittels des CD4⁺-Transferexperiments gezeigt werden konnte.

4.2 Transmaternale Asthmaprotektion in den Nachkommen durch veränderte Histon H4-Acetylierung am IFN γ -Promotor

In epidemiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass die bakterielle Exposition auf traditionellen Bauernhöfen, vor allen pränatal und im Kleinkindalter, mit der Protektion vor allergischen Erkrankungen einschließlich des Asthma bronchiale assoziiert ist (von Mutius 2000, Riedler 2001, Braun-Fahrlander 2002, Alfvén 2006, Pfefferle 2009).

Im Rahmen dieser Studien konnten zwei Keime (*A. lwoffii* F78 und *L. lactis* G121) isoliert werden, die nach intranasaler Exposition asthmaprotektive Eigenschaften im Tiermodell aufwiesen (Debarry 2007). In Nachahmung der bakteriellen Exposition von schwangeren Frauen auf einem Bauernhof mittels eines Mausmodells konnte in der Arbeitsgruppe weiterhin gezeigt werden, dass bereits die maternale Exposition mit dem apathogenen gram-negativen Keim *A. lwoffii* F78 als Modellkeim, zu einer deutlichen Reduktion des asthmatischen Phänotyps in den Nachkommen führt (Conrad 2009). Damit konnte weiterhin bestätigt werden, dass gerade die pränatale Phase als zeitliches Fenster

(„Window-of-Opportunity“) für die Beeinflussung durch exogene Faktoren von essentieller Bedeutung ist.

Nachdem im ersten Teil dieser Arbeit die Beteiligung epigenetischer Regulationsmechanismen in Bezug auf die Entwicklung von experimentellem Asthma dargestellt werden konnte, sollte nun im zweiten Teil dieser Arbeit analysiert werden, inwiefern eine Veränderung des asthmatischen Phänotyps, induziert durch pränatale Umwelteinflüsse in Form mikrobieller Stimuli (*A. lwoffii* F78), durch Modulation epigenetischer Mechanismen verursacht sein könnte. Hier stellte sich konkret die Frage, ob die pränatale Exposition zur Beeinflussung der frühen T-Zell-Entwicklung führt, einhergehend mit einer differenzierten epigenetischen Regulation in diesen Zellen während der allergischen Immunantwort im erwachsenen Tier.

Daher sollten, aufbauend auf dem bereits bei Conrad und Kollegen (2009) verwendeten pränatalen Modell des experimentellen Asthmas (Abb. 2.4), die molekularen Mechanismen, die der mikrobiell vermittelten Asthmaprotektion zugrunde liegen, näher untersucht werden.

4.2.1 Pränatale *A. lwoffii* F78-Exposition führt zur Verschiebung der Th1/Th2-Balance

In der vorliegenden Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass die pränatale Exposition mit dem Bakterium *A. lwoffii* F78, die zu einer Verminderung des asthmatischen Phänotyps in den Tieren führt, einherging mit einer Verschiebung der Th1/Th2-Balance in Richtung Th1, da es zu einer erhöhten IFN γ -Produktion und einer erniedrigten IL-4-, IL-5- und IL-13-Produktion durch MNCs von pränatal exponierten Mäusen kam. Gleiches konnte auch auf mRNA-Ebene bei CD4⁺CD25⁻-T-Zellen aus der Milz nachgewiesen werden.

In dieser Hinsicht ist bekannt, dass das Th1-Zytokin IFN γ ein potenter Suppressor der Th2-vermittelten allergischen Immunantwort ist, indem es Th2-Zell-Differenzierung und -Aktivierung inhibiert (O'Garra 2000, Murphy 2002). In Folge dessen kommt es zu einer Verhinderung der Ausbildung einer Th2-getriggerten Entzündungsreaktion einhergehend mit Atemwegshyperreagibilität, Eosinophilie und der Bildung Mukus-produzierender Becherzellen (Lack 1994, Busse 2003, Dow 1999). In diesem Zusammenhang wurde in humanen Studien das Zytokinexpressions-Muster von Kindern in Bezug auf Allergie-Entwicklung bereits intensiv untersucht (Prescott 2007). Hierbei konnte demonstriert

werden, dass T-Zellen von Kindern, die später in ihrem Leben eine allergische Erkrankung entwickeln, generell geringere IFN γ -Mengen produzieren, als T-Zellen von Kindern ohne spätere Allergie (Rowe 2004). Dementsprechend zeigen Zellen aus dem Nabelschnurblut von „Bauernhofkindern“, die bereits pränatal einem bakteriellen Milieu ausgesetzt sind und eine geringe Allergie- und Asthmarate aufweisen (Riedler 2001), eine höhere Kapazität IFN γ zu produzieren. Dies unterstützt die Annahme, dass es einen direkten Einfluss von Umweltfaktoren auf die pränatale Entwicklung von T-Zellen gibt (Pfefferle 2009). Die in diesen Studien erhobenen Daten stimmen mit den in dieser Arbeit gefunden Ergebnissen aus dem Tiermodell überein, da auch hier eine erhöhte IFN γ -Produktion mit einem geringeren Phänotyp verbunden war.

Zum endgültigen Nachweis, dass die in Th1-Richtung verschobene Th1/Th2-Balance essentiell für den reduzierten asthmatischen Phänotyp in diesem Tiermodell ist, wurde die erhöhte IFN γ -Produktion in den pränatal *A. lwoffii* F78 exponierten Tieren während der Provokationsphase mittels eines neutralisierenden anti-IFN γ -Antikörpers blockiert. Dies resultierte in einer vollständigen Wiederherstellung des asthmatischen Phänotyps in den Tieren.

Sowohl die erhöhte IFN γ -Produktion nach pränataler *A. lwoffii* F78-Exposition, als auch der Tatbestand, dass die Blockade von IFN γ mittels eines Antikörpers wieder zu einer vollständigen Ausprägung des experimentellen Asthmas führte, belegen die Bedeutung der adaptiven Immunantwort, im speziellen der Th1/Th2-Balance und damit auch von CD4⁺-T-Helfer-Zellen bei der Regulation der Asthmaprotektion durch transmaternale Umwelteinflüsse.

Neben Th1- und Th2-Zellen wurden weiterhin Tregs als wichtige Regulatoren von immunologischen Prozessen in Bezug auf Toleranz gegenüber Allergenen identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl natürlich vorkommende CD4⁺CD25⁺-Tregs, als auch induzierbare allergen-spezifische, IL-10-sezernierende Tregs (T_R1) allergen-spezifische Effektorzellen in experimentellen Tiermodellen inhibieren und somit den asthmatischen Phänotyp beeinflussen können (Kearly 2005, Kearly 2008, Cottrez 2000, Akbari 2002). Da jedoch keinerlei Veränderung nach pränataler *A. lwoffii* F78-Exposition in Bezug auf IL-10 als Treg-Marker detektiert wurde und auch der Anteil CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺-T-Zellen unverändert war, wurde die Rolle von Tregs in dieser Arbeit nicht weiter analysiert.

4.2.2 A. *Iwoffii* F78-vermittelte Asthma-Reduktion ist assoziiert mit epigenetischer Modifikation in CD4⁺-T-Zellen

Nachdem die Bedeutung der adaptiven Immunantwort bei der pränatalen Asthmaprävention unterstrichen werden konnte, stellte sich die Frage nach den molekularen Mechanismen, die in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen könnten. Es ist bekannt, dass epigenetische Prozesse zu Veränderungen des Phänotyps führen können, die nicht durch Veränderungen des Genotyps bedingt sind. Dass solche Veränderungen epigenetischer Regulationsprozesse als Folge von komplexen Gen-Umwelt-Interaktionen auftreten und diese Veränderungen mit einer Beeinflussung des asthmatischen Phänotyps assoziiert sein können, konnte in initialen Studien sowohl im Menschen als auch im Tiermodell bereits gezeigt werden (Liu 2007, Hollingsworth 2008, Kwon 2008, Perera 2009). So tragen epigenetische Prozesse zur Plastizität der Genexpression bei und sind von entscheidender Bedeutung für Entwicklungsprozesse und Zelldifferenzierung, einschließlich der Reifung und Differenzierung der verschiedenen T-Helfer-Zell-Subpopulationen (Ansel 2003, Wilson 2009, Janson 2009). In dieser Hinsicht konnte im ersten Teil dieser Arbeit bereits nachgewiesen werden, dass nicht nur eine Assoziation zwischen epigenetischen Veränderungen in CD4⁺-T-Zellen und der Schwere von Asthma besteht, sondern dass tatsächlich ein essentieller Zusammenhang zwischen der Modulation epigenetischer Mechanismen in diesen Zellen und der Ausprägung experimentellen Asthmas existiert.

Aufgrund des Ergebnisses, dass die Th1/Th2-Balance von entscheidender Bedeutung für die Asthma-Protektion nach pränataler A. *Iwoffii* F78-Exposition ist, wurde der Fokus für die Untersuchung epigenetischer Regulation auf Gene der adaptiven Immunantwort gelegt und Genregionen des Th1- (IFN γ -Promotor) und Th2-Lokus (IL-4-, IL-5-Promotor und CNS-1) von CD4⁺CD25⁻-T-Zellen aus der Milz als Kandidaten ausgewählt. Der Grund für die Analyse von CD4⁺CD25⁻-T-Zellen lag zum einen darin, dass auf mRNA-Ebene eine veränderte Th1/Th2-Balance in dieser Zellpopulation bestätigt werden konnte und zum anderen sollten Tregs aus der Analyse ausgeschlossen werden. Neben der Analyse von DNA-Methylierung innerhalb der erwähnten Genregionen wurden auch Histonmodifikationen im Bereich der Promotorregionen von IFN γ , IL-4 und IL-5 sowie der Enhancer-Region CNS-1 analysiert, wobei H4-Acetylierung als Aktivierungsmarker und H3K27-Trimethylierung als Marker für Repression untersucht wurde.

Obwohl eine erhöhte IFN γ -Expression durch CD4⁺-T-Zellen nach pränataler *A. lwoffii* F78-Exposition gezeigt werden konnte, konnten in Bezug auf DNA-Methylierung am IFN γ -Promotor in den in dieser Arbeit durchgeführten *in vivo* Experimenten keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass dieser Regulationsmechanismus am IFN γ -Promotor in diesem Zusammenhang nur eine untergeordnete Rolle spielt, zumal sich die DNA-Methylierung innerhalb dieser Genregion im Verlauf der Th1-Differenzierung, die eine erhöhte IFN γ -Produktion zur Folge hat, nicht verändert (Jones 2006).

Neben der erhöhten IFN γ -Produktion, zeigte sich weiterhin eine erniedrigte Produktion der Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 in den OVA-sensibilisierten und provozierten Tieren. Die Analyse des DNA-Methylierungsgrades innerhalb der Promotorregionen von IL-4 und IL-5, als auch einer intergenischen Region des Th2-Transkriptionsfaktors Gata-3 (Daten nicht gezeigt) zeigten jedoch keinerlei Unterschiede zwischen pränatal *A. lwoffii* F78-exponierten und PBS-exponierten Tieren. Dies deutet darauf hin, dass auch in diesen Genregionen epigenetische Modulation in Form von DNA-Methylierung bei der *A. lwoffii* F78-vermittelten Asthmaprotektion keine Rolle spielt. Nur in Bezug auf die Th2-genregulatorische Region CNS-1 ließ sich eine Erhöhung der CpG-Methylierung für einige der 13 untersuchten CpG-Motive feststellen.

Somit scheint die Reduktion der Th2-Zytokin-Expression hauptsächlich durch den regulatorischen Effekt der erhöhten IFN γ -Produktion in diesen Tieren bedingt zu sein, da bekannt ist, dass IFN γ einen starken inhibitorischen Effekt auf die Entwicklung, Differenzierung und Aktivierung von Th2-Zellen hat (O'Garra 2000, Murphy 2002).

Hiermit ließen sich die Ergebnisse aus dem ersten Teil dieser Arbeit nicht auf die epigenetische Situation nach pränataler *A. lwoffii* F78-Exposition übertragen. Im Gegensatz zur direkten Beeinflussung epigenetischer Regulationsmechanismen im erwachsenen Tier wird eine Exposition mit exogenen Faktoren in der pränatalen Phase wahrscheinlich eher Einfluss auf die frühen Prozesse der T-Zell-Entwicklung nehmen und so die spätere immunologische Reaktion auf Allergene beeinflussen.

Neben der DNA-Methylierung spielen aber auch noch weitere epigenetische Mechanismen wie Histonmodifikationen eine bedeutende Rolle bei der Regulation von Genexpression. In diesem Zusammenhang werden bestimmten Histonmodifikationen aktivierende und anderen Histonmodifikationen repressive Eigenschaften zugesprochen (s. Tab. 1.1). Daher wurden neben dem DNA-Methylierungsgrad auch Histonmodifikation

der Th1- und Th2-Genregionen analysiert. Im Gegensatz zur DNA-Methylierung konnte hier in Bezug auf die H4-Acetylierung im Bereich des IFN γ -Promotors, in Korrelation mit der gesteigerten IFN γ -Produktion, eine signifikante Erhöhung nach pränataler *A. lwoffii* F78-Exposition detektiert werden, während der repressive Marker H3K27-Trimethylierung nicht verändert war.

In Bezug auf den Th2-Lokus zeigte sich die H4-Acetylierung im Bereich des IL-5-Promotors und der CNS-1-Region nicht beeinflusst, wohingegen die H4-Acetylierung am IL-4-Promotor nach pränataler *A. lwoffii* F78-Exposition signifikant verringert war. Eine Beeinflussung der repressiven H3K27-Trimethylierung konnte an keiner der untersuchten Genregionen festgestellt werden. Diese Veränderungen der H4-Acetylierung im Bereich des IL-4-Promotors und dem gering erhöhten CpG-Methylierungsgrad der CNS-1-Region unterstützen weiterhin, neben dem Th2-inhibitorischen Effekt von IFN γ , die Suppression der Th2-Zytokinproduktion.

Dementsprechend könnte die stark erhöhte H4-Acetylierung am IFN γ -Promotor in Verbindung mit der erniedrigten H4-Acetylierung am IL-4-Promotor und der erhöhten CpG-Methylierung der CNS-1-Region in Bezug auf die *A. lwoffii* F78-vermittelte Asthmaprävention in diesem pränatalen Tiermodell synergistisch wirken.

4.2.3 H4-Acetylierung vermittelt erhöhte IFN γ -Produktion und reduzierten asthmatischen Phänotyp

Die bisher diskutierten Daten hinsichtlich epigenetischer Modulation weisen auf eine wichtige Rolle der H4-Acetylierung in Bezug auf die Transkriptionskontrolle am IFN γ -Lokus hin, da hier der stärkste Effekt beobachtet werden konnte. H4-Acetylierung ist ein wichtiger Marker für eine offene Chromatinstruktur und damit für aktive Expression und die festgestellten Veränderungen der H4-Acetylierung am IFN γ -Promotor in CD4⁺-T-Zellen korrelieren in der Tat mit gesteigerter IFN γ -Protein-Produktion dieser Zellen. Zur genaueren Analyse der Rolle von Histonacetylierung in diesem Zusammenhang wurden Tiere in einem weiteren Experiment mit Garcinol behandelt. Garcinol ist ein potenter Inhibitor der Histonacetyltransferasen p300 und PCAF (Balasubramanyam 2004, Mantelingu 2007) und verhindert daher *de novo* Acetylierung. Die Behandlung der Tiere mit diesem Inhibitor wurde hier im gleichen Zeitraum durchgeführt, in dem die funktionelle Blockade von IFN γ mit Hilfe eines Antikörpers signifikante Effekte bewirkt hatte. Bei diesen Experimenten hatte sich gezeigt, dass die Phase der Allergenprovokation

einen wichtigen Zeitraum darstellt, in dem sich regulatorische Ereignisse in Bezug auf die Asthmaprävention abspielen.

Da Eingriffe in epigenetische Regulationsmechanismen zytostatische bzw. zytotoxische Auswirkungen auf Zellen haben können, wurde initial untersucht, inwiefern Garcinol möglicherweise solche Effekte auf Tiere bzw. deren Zellen ausübt. Dabei konnte für die hier verwendete Garcinol-Konzentration unspezifische zytotoxische Effekte ausgeschlossen werden, da zum einen keine Veränderungen in Verhalten und Gewicht der Tiere festgestellt wurden und darüberhinaus Zellviabilität, T-Zell-Aktivierung die Proliferationsfähigkeit von Zellen *in vivo* und *in vitro* nicht beeinträchtigt waren. Nach Garcinol-Behandlung wurde zudem der Grad der H4-Acetylierung am IFN γ -Promotor analysiert, was bestätigte, dass die Behandlung tatsächlich die *A. lwoffii* F78-assozierte Erhöhung der H4-Acetylierung innerhalb dieser Genregion verhinderte. Die Blockade dieses *A. lwoffii* F78-vermittelten Effekts spiegelte sich wiederum in den IFN γ -Proteinspiegeln wieder, da die nach pränataler *A. lwoffii* F78-Exposition vorhandene Erhöhung der IFN γ -Produktion in den Garcinol behandelten Tieren nicht auftrat. Zusätzlich zu der erniedrigten H4-Acetylierung am IFN γ -Promotor und der erniedrigten IFN γ -Produktion, zeigte sich eine komplette Aufhebung der *A. lwoffii* F78-vermittelten Asthmaprävention nach Behandlung mit dem Histonacetyltransferase-Inhibitor. Es kam zu einer vollständigen Etablierung des asthmatischen Phänotyps.

Diese Ergebnisse liefern einen starken Hinweis darauf, dass H4-Acetylierung der Histone im Bereich des IFN γ -Promotors während des Zeitrahmens der Allergenprovokation, an dem sich der asthmatische Phänotyp entwickelt, einen wichtigen Mechanismus für auf die Asthmaprävention in diesem Tiermodell darstellt.

4.2.4 Faktoren, die zur mikrobiell-vermittelten Asthmaprotektion beitragen könnten

Bis heute ist noch nicht geklärt, welche Faktoren für die Aktivierung und Regulierung von DNA-Methyltransferasen und/oder Histon-modifizierender Enzyme verantwortlich sind (Hodge 2005, Hodge 2001, Wehbe 2006, Stenvinkel 2007, Hahn 2008, Yang 2008). Es wird diskutiert, dass inflammatorische Bedingungen auf verschiedenen Ebenen, einschließlich der Produktion von IL-6, reaktiven Sauerstoff-Spezies und IKK α -Aktivierung bei der Aktivierung dieser Enzyme eine Rolle spielen könnten. Insbesondere IL-6 könnte ein relevanter Mediator in Bezug auf die hier beobachteten Effekte im

Pränatal-Modell sein, zumal von der Arbeitsgruppe kürzlich gezeigt werden konnte, dass der *A. lwoffii* F78-vermittelte Effekt von einer Erkennung des Bakteriums durch Toll-like-Rezeptoren (TLR) auf der mütterlichen Seite abhängig ist, in dessen Folge es zu einer erhöhten IL-6 Produktion in den Müttern kommt. Möglicherweise spielt daher IL-6 eine wichtige Rolle spielt bei der Übertragung von Asthmaprotektion von der Mutter auf deren Nachkommen (Conrad 2009). Hier sind jedoch weitere Studien nötig, um den Mechanismus der transmaternalen Vermittlung der Asthmaprotektion endgültig aufzuklären.

Bezüglich veränderter epigenetischer Regulationsmechanismen in den Nachkommen *A. lwoffii* F78-exponierter Mütter ist natürlich nicht auszuschließen, dass neben den in dieser Arbeit untersuchten CD4⁺CD25⁻-T-Zellen aus der Milz und Th1/Th2-spezifischen Genloci noch weitere Zellpopulationen in verschiedenen Kompartimenten und weitere Genloci von epigenetischen Veränderungen betroffen sind, die zu der Prävention des asthmatischen Phänotyps beitragen können. So könnte z.B. eine veränderte Reaktion von APCs der Lunge auf das Allergen dazu beitragen, dass es eher zu einer Th1-vermittelten Immunantwort kommt (Lambrecht 2009). Auch CD8⁺- und NK-Zellen könnten hier eine Rolle spielen, da bekannt ist, dass auch diese Zellen große Mengen an IFN γ produzieren können (Billiau 2009) und damit zu der hier beobachteten Asthmaprävention beitragen könnten. Weiterhin könnten neben den untersuchten Th1/Th2-Loci auch Genloci verschiedenster Transkriptionsfaktoren oder auch weiterer Zytokine von epigenetischen Veränderungen betroffen sein und in Folge im pränatalen Modell der Asthmaprävention eine Rolle spielen. Um diese Aspekte zu untersuchen sind jedoch, wie für die Untersuchung der Mechanismen auf maternaler Seite auch, noch eine Reihe weiterer Studien nötig, wobei genomweite Ansätze, z.B. in Form von DNA-Methylierungsarrays oder ChIP-on-chips für Histonmodifikationen (Gottardo 2009, Thu 2010), interessante methodische Ansätze zur Aufdeckung weiterer epigenetischer Veränderungen darstellen würden.

4.2.5 Fazit

Bei zusammenfassender Betrachtung liefern die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zum ersten Mal einen direkten Hinweis darauf, dass die durch maternale bakterielle Exposition vermittelte Asthmaprotektion in den Nachkommen über epigenetische Regulationsprozesse vermittelt sein könnte. Hier konnte gezeigt werden,

dass die pränatale Exposition mit dem gram-negativen Bakterium *A. lwoffii* F78, als Stellvertreter für eine bakterielle Exposition auf einem Bauernhof, zu einer charakteristischen Veränderung epigenetischer Merkmale an spezifischen Genloci innerhalb von CD4⁺CD25⁻-T-Zellen führt. Dies schließt den IFN γ -Promotor, den IL-4-Promotor und die Th2-regulatorische CNS-1-Region mit ein. Diese epigenetischen Effekte sind assoziiert mit einer entsprechenden Veränderung der Zytokinproduktion resultierend in einer Prävention des asthmatischen Phänotyps.

Diese Daten unterstützen damit das Konzept, dass pränatale Exposition eine wichtige Rolle bei der Allergie- und Asthma-Prävention spielt und weiterhin, dass epigenetische Regulationsmechanismen sowohl auf der Ebene der DNA-Methylierung, als auch auf der Ebene der Histon-Acetylierung, wichtige Mechanismen dafür darstellen.

Die Bedeutung der mikrobiellen Exposition für die Th1-Zytokin-Produktion und der damit einhergehenden Allergieprotektion sowie die ersten Einblicke in die diesem Effekt zugrunde liegenden Mechanismen bieten viele Ansatzpunkte für das Langzeit-Ziel, das hinter der Erforschung der allergie- und asthmaprotektiven Effekte des Bakteriums steht. Für die Entwicklung von allergieprotektiven Behandlungen und Therapiestrategien sollen die für die Allergieprotektion erforderlichen zugrunde liegenden Mechanismen, eingehend untersucht und aufgeklärt werden, um diese in der Klinik später effektiv und effizient anwenden zu können. So könnten die hier durchgeführten Untersuchungen die Weiterentwicklung einer Vakzinierungsstrategie gegen allergisches Asthma bronchiale auf der Basis von Immunmodulation durch mikrobielle Komponenten mechanistisch untermauern und damit einer klinischen Phase näher bringen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Epigenetische Modulation in Form von DNA-Methylierung ist assoziiert mit der Differenzierung von T-Helfer (Th)1- und Th2-Zellen, wobei letzere für die Dirigierung der allergischen Immunantwort eine bedeutende Rolle spielen. Daher wurde in dieser Arbeit zunächst untersucht, ob eine veränderte epigenetische Signatur die allergische Sensibilisierung und damit auch den asthmatischen Phänotyp in einem Tiermodell des experimentellen Asthmas beeinflussen kann. Dazu wurden Balb/c-Mäuse mit Ovalbumin (OVA) sensibilisiert und provoziert. Während der Sensibilisierungsphase wurden die Tiere mit dem DNA-Methyltransferase Inhibitor 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5Aza) intraperitoneal behandelt. Um in diesem Zusammenhang zusätzlich die Rolle von T-Zellen hervorzuheben, wurde zudem ein adoptiver Transfer von CD4⁺-T-Zellen aus 5Aza- oder PBS-behandelten sensibilisierten OVA-T-Zell-Rezeptor transgenen (DO11.10)-Donormäusen durchgeführt und der asthmatische Phänotyp in OVA-provozierten Wildtyp (WT)-Balb/c-Rezipienten analysiert. Sowohl nach der systemischen Administration, als auch nach dem adoptiven Transfer von CD4⁺-T-Zellen, resultierte die Behandlung mit 5Aza in einer signifikanten Reduktion des asthmatischen Phänotyps. Zusätzlich konnte in mononukleären Zellen (MNCs) aus der Milz eine höhere Demethylierung am Th1-Lokus (Interferon gamma (IFN γ)-Promotor) im Vergleich zum Th2-Lokus (Conserved-Noncoding-Sequence (CNS)-1, Interleukin (IL)-4- und IL-5 Promotor) festgestellt werden. Dies korrelierte mit einer erhöhten IFN γ -Produktion in diesen Zellen nach antiCD3/antiCD28-Stimulation. Weiterhin korrelierten die Spiegel der OVA-spezifischen Antikörper mit den Unterschieden in der Zytokin-Produktion, da die Immunglobulin (Ig)G2a-Produktion erhöht und die Mengen an IgE und IgG1 nach 5Aza-Behandlung erniedrigt waren. Diese Ergebnisse zeigen, dass der DNA-Methylierungsgrad spezifischer Genregionen, insbesondere in CD4⁺-T-Zellen, einen Einfluss auf die Sensibilisierung gegenüber dem Allergen OVA und nachfolgend auf die Entwicklung des asthmatischen Phänotyps in diesem Modell hat.

Es ist bekannt, dass epigenetische Regulation durch komplexe Gen-Umwelt-Interaktionen moduliert werden kann. Daher wurde im zweiten Teil dieser Arbeit die Rolle epigenetischer Regulation bei der mikrobiell-vermittelten transmaternalen Asthma-Protektion untersucht. Dazu wurden Balb/c-Mäuse während der Schwangerschaft mit dem apathogenen, gram-negativen Bakterium *Acinetobacter lwoffii* F78 (*A. lwoffii* F78) intranasal behandelt und die Nachkommen dieser Tiere anschließend mit OVA

sensibilisiert und provoziert. Die pränatale *A. lwoffii* F78-Exposition führte zu einer Veränderung der Th1/Th2-Balance, da die IFN γ -Produktion von MNCs aus der Milz nach antiCD3/antiCD28-Stimulation erhöht und die Produktion von IL-4, IL-5 und IL-13 erniedrigt war, einhergehend mit einer signifikanten Reduktion des asthmatischen Phänotyps (Atemwegsentzündung, Mukusproduktion, Atemwegshyperreagibilität) in diesen Tieren. Dieser Effekt scheint von der erhöhten IFN γ -Produktion und damit der verschobenen Th1/Th2-Balance abhängig zu sein, da die funktionelle Inhibition von IFN γ mit einem neutralisierenden Antikörper zur Wiederherstellung des asthmatischen Phänotyps führte. Daher wurden DNA-Methylierung und posttranslationale Histonmodifikationen in Th1- und Th2-regulatorischen Genregionen von CD4⁺CD25⁻-T-Zellen aus der Milz von Nachkommen *A. lwoffii* F78-exponierter Mütter nach OVA-Sensibilisierung und -Provokation analysiert. Hier zeigte sich am IFN γ -Promotor eine signifikante Erhöhung der Histon H4-Acetylierung, aber keine Veränderungen in der Histon H3 Lysin (K) 27-Trimethylierung und im DNA-Methylierungsgrad. In Bezug auf die Th2-Genregion zeigte sich ein erhöhter DNA-Methylierungsgrad an einigen CpG-Positionen der Enhancer-Region CNS-1, jedoch kein Effekt an den Promotorregionen von IL-4 und IL-5. Die Analyse der Histonmodifikationen des Th2-Lokus zeigte alleinig einen Einfluss auf den IL-4-Promotor, hier kam es gegenläufig zum IFN γ -Promotor zu einer Erniedrigung der H4-Acetylierung. Um die Relevanz der veränderten H4-Acetylierung am IFN γ -Promotor weiter zu untersuchen, wurden die Nachkommen während der OVA-Provokation zusätzlich mit Garcinol, einem Histonacetyltransferase-Inhibitor, behandelt. Diese Behandlung resultierte in der Aufhebung der Asthma-Protektion einhergehend mit der Inhibierung der H4-Acetylierung am IFN γ -Promotor.

Die hier erhaltenen Daten liefern somit einen ersten Hinweis, dass epigenetische Regulation innerhalb von Th1/Th2-Zytokin-Genen von CD4⁺-T-Zellen, insbesondere am IFN γ -Promotor, eine wichtige Rolle bei der Astmaprotektion spielt, welche vermittelt wird durch die pränatale Exposition mit dem Modellkeim *A. lwoffii* F78.

5.1 Summary

DNA methylation has been shown to be associated with the differentiation of T-helper (Th)1- and Th2 cells, the latter are known to play an important role in the orchestration of allergic responses. Based on these findings the hypothesis was generated that an altered epigenetic signature may influence the allergic sensitization and thus the asthmatic

outcome in an animal model of experimental asthma. To investigate the impact of DNA methylation on the development of the asthmatic phenotype, Balb/c-mice were Ovalbumin (OVA)-sensitized and -challenged. During sensitization animals were intraperitoneally treated with the DNA-methyltransferase-inhibitor 5-Aza-2'-Deoxycytidine (5Aza). To further prove the role of DNA methylation in T-cells in this context, an adoptive transfer of CD4⁺ T-cells from 5Aza- or PBS-treated OVA-sensitized OVA-T-cell-receptor transgenic (DO11.10) donor mice was performed and the asthmatic phenotype was assessed in OVA-aerosol challenged wildtype (WT) Balb/c recipient mice. After systemic administration as well as after adoptive transfer of CD4⁺ T-cells, 5Aza-treatment resulted in a reduced asthmatic phenotype. Additionally, a higher demethylation within the Th1 region (Interferon gamma (IFN γ) promoter) in comparison to the Th2 region (Conserved-Noncoding-Sequence (CNS-1), Interleukin (IL)-4 and IL-5 promoter) in splenic mononuclear cells (MNCs) was observed which correlated with a higher IFN γ production in these cells after anti-CD3/anti-CD28 stimulation. Furthermore, OVA-specific antibody levels correlated with altered cytokine production, since increased Immunoglobuline (Ig)G2a and lower levels of IgE and IgG1 were observed after 5Aza treatment. In conclusion, these results suggest an impact of the DNA methylation level within specific gene regions, in particular in CD4⁺ T-cells, on sensitization to the allergen OVA and thereby on the development of the asthmatic phenotype in the model.

It is known that epigenetic mechanisms might be modulated by complex gene-environment interactions. To examine the role of epigenetic regulation in transmaternal asthma protection, pregnant mother mice were exposed to the non-pathogenic gram-negative bacterium *Acinetobacter lwoffii* F78 (*A. lwoffii* F78) and offspring mice were OVA sensitized and challenged. Prenatal *A. lwoffii* F78 administration led to a changed Th1/Th2 balance in the offspring as shown by an increased IFN γ production and decreased in IL-4, IL-5 and IL-13 production after anti-CD3/anti-CD28 stimulation of splenic MNCs. Furthermore the development of experimental asthma (airway inflammation, mucus production, airway hyperresponsiveness) in the progeny was significantly reduced. This effect seemed to be dependent on the elevated IFN γ production since functional inhibition of IFN γ with a neutralizing antibody restored the asthmatic phenotype. Therefore, DNA methylation and posttranslational histone modifications were analyzed in Th1 and Th2 regulatory gene regions of CD4⁺CD25⁻ T-cells from OVA sensitized and challenged offspring. A significant increase in histone H4 acetylation was observed in the IFN γ promoter region, whereas neither changes in Histone H3 lysine (K) 27 trimethylation

nor in CpG methylation were detected. For Th2 gene regions CpG methylation within the IL-4 and IL-5 promoters remained unchanged, whereas some CpG positions within the CNS-1 region showed an increased methylation level after prenatal *A. lwoffii* F78 exposure. Regarding histone modifications only influences on the IL-4 promoter were detected, where a decrease of H4 acetylation was observed. To further investigate the relevance of altered H4 acetylation at the IFN γ promoter, offspring mice were treated with the histone acetyltransferase inhibitor Garcinol. This treatment abolished the asthma protective phenotype paralleled by inhibition of H4 acetylation of the IFN γ promoter.

These data provide first evidence that epigenetic regulation of Th1/Th2 cytokine genes in CD4⁺ T-cells, in particular of the IFN γ promoter, plays an important role in asthma protection mediated by prenatal exposure to the model microbe *A. lwoffii* F78.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Genes for asthma? An analysis of the European Community Respiratory Health Survey. **1997.** *Am J Respir Crit Care Med* 156:1773-1780.

Worldwide variation in prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and atopic eczema: ISAAC. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. **1998.** *Lancet* 351:1225-1232.

Expert Panel Report 3 (EPR-3): Guidelines for the Diagnosis and Management of Asthma-Summary Report 2007. **2007.** *J Allergy Clin Immunol* 120:S94-138.

Agarwal, S. and Rao, A. Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation. **1998.** *Immunity* 9:765-775.

Agarwal, S. and Rao, A. Long-range transcriptional regulation of cytokine gene expression. **1998.** *Curr.Opin.Immunol* 10:345-352.

Ahmadian, A., Ehn, M., and Hober, S. Pyrosequencing: history, biochemistry and future. **2006.** *Clin Chim.Acta* 363:83-94.

Akbari, O., Freeman, G. J. , Meyer, E. H., Greenfield, E. A., Chang, T. T., Sharpe, A. H., Berry, G., DeKruyff, R. H., and Umetsu, D. T. Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. **2002.** *Nat.Med* 8:1024-1032.

Akdis, M., Verhagen, J., Taylor, A., Karamloo, F., Karagiannidis, C., Crameri, R., Thunberg, S., Deniz, G., Valenta, R., Fiebig, H., Kegel, C., Disch, R., Schmidt-Weber, C. B., Blaser, K., and Akdis, C. A. Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells . **2004.** *J Exp Med* 199:1567-1575.

Alfven, T., Braun-Fahrlander, C., Brunekreef, B., von Mutius, E., Riedler, J., Scheynius, A., van Hage, M., Wickman, M., Benz, M. R., Budde, J., Michels, K. B., Schram, D., Ublagger, E., Waser, M., and Pershagen, G. Allergic diseases and atopic sensitization in children related to farming and anthroposophic lifestyle--the PARSIFAL study. **2006.** *Allergy* 61:414-421.

Annunziato, F. and Romagnani, S. Heterogeneity of human effector CD4+ T cells. **2009.** *Arthritis Res.Ther.* 11:257.

Ansel, K. M., Lee, D. U., and Rao, A. An epigenetic view of helper T cell differentiation. **2003.** *Nat.Immunol* 4:616-623.

Ansel, K. M., Djuretic, I. , Tanasa, B., and Rao, A. Regulation of Th2 differentiation and Il4 locus accessibility. **2006.** *Annu.Rev Immunol* 24:607-656.

Avni, O., Lee, D., Macian, F., Szabo, S. J., Glimcher, L. H., and Rao, A. T(H) cell differentiation is accompanied by dynamic changes in histone acetylation of cytokine genes. **2002.** *Nat.Immunol* 3:643-651.

Baguet, A. and Bix, M. Chromatin landscape dynamics of the Il4-Il13 locus during T helper 1 and 2 development. **2004.** *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 101:11410-11415.

Balasubramanyam, K., Altaf, M., Varier, R. A., Swaminathan, V., Ravindran, A., Sadhale, P. P., and Kundu, T. K. Polyisoprenylated benzophenone, garcinol, a natural histone acetyltransferase

inhibitor, represses chromatin transcription and alters global gene expression. **2004.** J Biol.Chem. 279:33716-33726.

Ball, T. M., Castro-Rodriguez, J. A., Griffith, K. A., Holberg, C. J., Martinez, F. D., and Wright, A. L. Siblings, day-care attendance, and the risk of asthma and wheezing during childhood. **2000.** N.Engl.J Med 343:538-543.

Barnes, K. C. Gene-environment and gene-gene interaction studies in the molecular genetic analysis of asthma and atopy. **1999.** Clin Exp Allergy 29 Suppl 4:47-51.

Barnes, P. J., Adcock, I. M., and Ito, K. Histone acetylation and deacetylation: importance in inflammatory lung diseases. **2005.** Eur.Respir J 25:552-563.

Barnes, P. J. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **2008.** J Clin Invest 118:3546-3556.

Barnes, P. J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **2008.** Nat.Rev Immunol 8:183-192.

Barros, S. P. and Offenbacher, S. Epigenetics: connecting environment and genotype to phenotype and disease. **2009.** J Dent.Res. 88:400-408.

Bateman, E. D., Hurd, S. S., Barnes, P. J., Bousquet, J., Drazen, J. M., FitzGerald, M., Gibson, P., Ohta, K., O'Byrne, P., Pedersen, S. E., Pizzichini, E., Sullivan, S. D., Wenzel, S. E., and Zar, H. J. Global strategy for asthma management and prevention: GINA executive summary. **2008.** Eur.Respir J 31:143-178.

Berger, S. L. The complex language of chromatin regulation during transcription. **2007.** Nature 447:407-412.

Bergeron, C. and Boulet, L. P. Structural changes in airway diseases: characteristics, mechanisms, consequences, and pharmacologic modulation. **2006.** Chest 129:1068-1087.

Billiau, A. and Matthys, P. Interferon-gamma: a historical perspective. **2009.** Cytokine Growth Factor Rev 20:97-113.

Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **2002.** Genes Dev. 16:6-21.

Bird, J. J., Brown, D. R., Mullen, A. C., Moskowitz, N. H., Mahowald, M. A., Sider, J. R., Gajewski, T. F., Wang, C. R., and Reiner, S. L. Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. **1998.** Immunity 9:229-237.

Bjorksten, B., Naaber, P., Sepp, E., and Mikelsaar, M. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. **1999.** Clin Exp Allergy 29:342-346.

Bjorksten, B., Sepp, E., Julge, K., Voor, T., and Mikelsaar, M. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. **2001.** J Allergy Clin Immunol 108:516-520.

Black, P. N. and Sharpe, S. Dietary fat and asthma: is there a connection? **1997.** Eur.Respir J 10:6-12.

Blumer, N., Herz, U., Wegmann, M., and Renz, H. Prenatal lipopolysaccharide-exposure prevents allergic sensitization and airway inflammation, but not airway responsiveness in a murine model of experimental asthma. **2005.** Clin Exp Allergy 35:397-402.

- Bousquet, J.,** Jeffery, P. K., Busse, W. W., Johnson, M., and Vignola, A. M. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. **2000.** *Am J Respir Crit Care Med* 161:1720-1745.
- Braun-Fahrlander, C.,** Riedler, J., Herz, U., Eder, W., Waser, M., Grize, L., Maisch, S., Carr, D., Gerlach, F., Bufer, A., Lauener, R. P., Schierl, R., Renz, H., Nowak, D., and von Mutius, E. Environmental exposure to endotoxin and its relation to asthma in school-age children. **2002.** *N.Engl.J Med* 347:869-877.
- Burke, W.,** Fesinmeyer, M., Reed, K., Hampson, L., and Carlsten, C. Family history as a predictor of asthma risk. **2003.** *Am J Prev.Med* 24:160-169.
- Burney, P.** The changing prevalence of asthma? **2002.** *Thorax* 57 Suppl 2:II36-II39.
- Busse, W. W. and Rosenwasser, L. J.** Mechanisms of asthma. **2003.** *J Allergy Clin Immunol* 111:S799-S804.
- Celedon, J. C.,** Litonjua, A. A., Weiss, S. T., and Gold, D. R. Day care attendance in the first year of life and illnesses of the upper and lower respiratory tract in children with a familial history of atopy. **1999.** *Pediatrics* 104:495-500.
- Chang, S. and Aune, T. M.** Dynamic changes in histone-methylation 'marks' across the locus encoding interferon-gamma during the differentiation of T helper type 2 cells. **2007.** *Nat.Immunol* 8:723-731.
- Cheng, J. C.,** Yoo, C. B., Weisenberger, D. J., Chuang, J., Wozniak, C., Liang, G., Marquez, V. E., Greer, S., Orntoft, T. F., Thykjaer, T., and Jones, P. A. Preferential response of cancer cells to zebularine. **2004.** *Cancer Cell* 6:151-158.
- Choi, J. H.,** Oh, S. W., Kang, M. S., Kwon, H. J., Oh, G. T., and Kim, D. Y. Trichostatin A attenuates airway inflammation in mouse asthma model. **2005.** *Clin Exp Allergy* 35:89-96.
- Christman, J. K.** 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. **2002.** *Oncogene* 21:5483-5495.
- Coffman, R. L.,** Savelkoul, H. F., and Lebman, D. A. Cytokine regulation of immunoglobulin isotype switching and expression. **1989.** *Semin.Immunol* 1:55-63.
- Cohn, L.,** Elias, J. A., and Chupp, G. L. Asthma: mechanisms of disease persistence and progression. **2004.** *Annu.Rev Immunol* 22:789-815.
- Collins, D. S.,** Dupuis, R. , Gleich, G. J., Bartemes, K. R., Koh, Y. Y., Pollice, M., Albertine, K. H., Fish, J. E., and Peters, S. P. Immunoglobulin E-mediated increase in vascular permeability correlates with eosinophilic inflammation. **1993.** *Am Rev Respir Dis.* 147:677-683.
- Conrad, M. L.,** Ferstl, R., Teich, R., Brand, S., Blumer, N., Yildirim, A. O., Patrascan, C. C., Hanuszkiewicz, A., Akira, S., Wagner, H., Holst, O., von Mutius, E., Pfefferle, P. I., Kirschning, C. J., Garn, H., and Renz, H. Maternal TLR signaling is required for prenatal asthma protection by the nonpathogenic microbe *Acinetobacter lwoffii* F78. **2009.** *J Exp Med* 206:2869-2877.
- Constant, S. L. and Bottomly, K.** Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. **1997.** *Annu.Rev Immunol* 15:297-322.
- Cookson, W.** The alliance of genes and environment in asthma and allergy. **1999.** *Nature* 402:B5-11.

- Cookson, W.** The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium. **2004.** *Nat.Rev Immunol* 4:978-988.
- Corry, D. B. and Kheradmand, F.** Induction and regulation of the IgE response. **1999.** *Nature* 402:B18-B23.
- Cottrez, F.,** Hurst, S. D., Coffman, R. L., and Groux, H. T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo. **2000.** *J Immunol* 165:4848-4853.
- Coyle, A. J.,** Le Gros, G., Bertrand, C., Tsuyuki, S., Heusser, C. H., Kopf, M., and Anderson, G. P. Interleukin-4 is required for the induction of lung Th2 mucosal immunity. **1995.** *Am J Respir Cell Mol Biol.* 13:54-59.
- Coyle, A. J.,** Tsuyuki, S., Bertrand, C., Huang, S. , Aguet, M., Alkan, S. S., and Anderson, G. P. Mice lacking the IFN-gamma receptor have impaired ability to resolve a lung eosinophilic inflammatory response associated with a prolonged capacity of T cells to exhibit a Th2 cytokine profile. **1996.** *J Immunol* 156:2680-2685.
- D'Amato, G.,** Liccardi, G., and D'Amato, M. Environmental risk factors (outdoor air pollution and climatic changes) and increased trend of respiratory allergy. **2000.** *J Investig.Allergol.Clin Immunol* 10:123-128.
- Daniels, S. E.,** Bhattacharrya, S., James, A., Leaves, N. I., Young, A., Hill, M. R., Faux, J. A., Ryan, G. F., le Souef, P. N., Lathrop, G. M., Musk, A. W., and Cookson, W. O. A genome-wide search for quantitative trait loci underlying asthma. **1996.** *Nature* 383:247-250.
- Debarry, J.,** Garn, H., Hanuszkiewicz, A., Dickgreber, N., Blumer, N., von Mutius, E., Bufe, A., Gattermann, S., Renz, H., Holst, O., and Heine, H. *Acinetobacter lwoffii* and *Lactococcus lactis* strains isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective properties. **2007.** *J Allergy Clin Immunol* 119:1514-1521.
- Devereux, G.** The increase in the prevalence of asthma and allergy: food for thought. **2006.** *Nat.Rev Immunol* 6:869-874.
- Dow, S. W.,** Schwarze, J., Heath, T. D., Potter, T. A., and Gelfand, E. W. Systemic and local interferon gamma gene delivery to the lungs for treatment of allergen-induced airway hyperresponsiveness in mice. **1999.** *Hum Gene Ther.* 10:1905-1914.
- Egger, G.,** Liang, G., Aparicio, A., and Jones, P. A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **2004.** *Nature* 429:457-463.
- Fedulov, A. V.,** Leme, A., Yang, Z., Dahl, M., Lim, R., Mariani, T. J., and Kobzik, L. Pulmonary exposure to particles during pregnancy causes increased neonatal asthma susceptibility. **2008.** *Am J Respir Cell Mol Biol.* 38:57-67.
- Feinberg, A. P.,** Ohlsson, R., and Henikoff, S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. **2006.** *Nat.Rev Genet* 7:21-33.
- Fields, P. E.,** Kim, S. T., and Flavell, R. A. Cutting edge: changes in histone acetylation at the IL-4 and IFN-gamma loci accompany Th1/Th2 differentiation. **2002.** *J Immunol* 169:647-650.
- Fireman, P.** Understanding asthma pathophysiology. **2003.** *Allergy Asthma Proc.* 24:79-83.
- Fitzpatrick, D. R.,** Shirley, K. M., McDonald, L. E., Bielefeldt-Ohmann, H., Kay, G. F., and Kelso, A. Distinct methylation of the interferon gamma (IFN-gamma) and interleukin 3 (IL-3) genes in newly activated primary CD8+ T lymphocytes: regional IFN-gamma promoter

demethylation and mRNA expression are heritable in CD44(high)CD8+ T cells. **1998.** J Exp Med 188:103-117.

Fitzpatrick, D. R., Shirley, K. M., and Kelso, A. Cutting edge: stable epigenetic inheritance of regional IFN-gamma promoter demethylation in CD44highCD8+ T lymphocytes. **1999.** J Immunol 162:5053-5057.

Flaishon, L., Topilski, I. , Shoseyov, D., Hershkovich, R., Fireman, E., Levo, Y., Marmor, S., and Shachar, I. Cutting edge: anti-inflammatory properties of low levels of IFN-gamma. **2002.** J Immunol 168:3707-3711.

Fogarty, A., Lewis, S., Weiss, S., and Britton, J. Dietary vitamin E, IgE concentrations, and atopy. **2000.** Lancet 356:1573-1574.

Fontenot, J. D., Gavin, M. A., and Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. **2003.** Nat.Immunol 4:330-336.

Foster, P. S., Hogan, S. P., Ramsay, A. J., Matthaei, K. I., and Young, I. G. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. **1996.** J Exp Med 183:195-201.

Galli, S. J., Tsai, M., and Piliponsky, A. M. The development of allergic inflammation. **2008.** Nature 454:445-454.

Geha, R. S., Jabara, H. H. , and Brodeur, S. R. The regulation of immunoglobulin E class-switch recombination. **2003.** Nat.Rev Immunol 3:721-732.

Gold, D. R. and Wright, R. Population disparities in asthma. **2005.** Annu.Rev Public Health 26:89-113.

Gottardo, R. Modeling and analysis of ChIP-chip experiments. **2009.** Methods Mol Biol. 567:133-143.

Hackanson, B., Robbel, C., Wijermans, P., and Lubbert, M. In vivo effects of decitabine in myelodysplasia and acute myeloid leukemia: review of cytogenetic and molecular studies. **2005.** Ann.Hematol. 84 Suppl 1:32-38.

Hahn, M. A., Hahn, T., Lee, D. H., Esworthy, R. S. , Kim, B. W., Riggs, A. D., Chu, F. F., and Pfeifer, G. P. Methylation of polycomb target genes in intestinal cancer is mediated by inflammation. **2008.** Cancer Res. 68:10280-10289.

Hatton, R. D., Harrington, L. E., Luther, R. J., Wakefield, T., Janowski, K. M., Oliver, J. R., Lallone, R. L., Murphy, K. M., and Weaver, C. T. A distal conserved sequence element controls Ifng gene expression by T cells and NK cells. **2006.** Immunity 25:717-729.

Heinrich, J., Popescu, M. A., Wjst, M., Goldstein, I. F., and Wichmann, H. E. Atopy in children and parental social class. **1998.** Am J Public Health 88:1319-1324.

Heinzmann, A., Blattmann, S., Forster, J., Kuehr, J., and Deichmann, K. A. Common polymorphisms and alternative splicing in the ILT3 gene are not associated with atopy. **2000.** Eur.J Immunogenet. 27:121-127.

Herceg, Z. Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors. **2007.** Mutagenesis 22:91-103.

- Hershey, G. K.**, Friedrich, M. F., Esswein, L. A., Thomas, M. L., and Chatila, T. A. The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor. **1997.** N.Engl.J Med 337:1720-1725.
- Hewagama, A. and Richardson, B.** The genetics and epigenetics of autoimmune diseases. **2009.** J Autoimmun. 33:3-11.
- Hodge, D. R.**, Xiao, W., Clausen, P. A., Heidecker, G., Szyf, M., and Farrar, W. L. Interleukin-6 regulation of the human DNA methyltransferase (HDNMT) gene in human erythroleukemia cells. **2001.** J Biol.Chem 276:39508-39511.
- Hodge, D. R.**, Peng, B., Cherry, J. C., Hurt, E. M. , Fox, S. D., Kelley, J. A., Munroe, D. J., and Farrar, W. L. Interleukin 6 supports the maintenance of p53 tumor suppressor gene promoter methylation. **2005.** Cancer Res. 65:4673-4682.
- Holgate, S.** Mediator and cytokine mechanisms in asthma. **1993.** Thorax 48:103-109.
- Holgate, S. T.** Genetic and environmental interaction in allergy and asthma. **1999.** J Allergy Clin Immunol 104:1139-1146.
- Hollingsworth, J. W.**, Maruoka, S., Boon, K., Garantziotis, S., Li, Z., Tomfohr, J., Bailey, N., Potts, E. N., Whitehead, G., Brass, D. M., and Schwartz, D. A. In utero supplementation with methyl donors enhances allergic airway disease in mice. **2008.** J Clin Invest 118:3462-3469.
- Holt, P. G.**, Macaubas, C., Stumbles, P. A., and Sly, P. D. The role of allergy in the development of asthma. **1999.** Nature 402:B12-B17.
- Huehn, J.**, Polansky, J. K. , and Hamann, A. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? **2009.** Nat.Rev Immunol 9:83-89.
- Huh, J. C.**, Strickland, D. H., Jahnsen, F. L., Turner, D. J., Thomas, J. A., Napoli, S., Tobagus, I., Stumbles, P. A., Sly, P. D., and Holt, P. G. Bidirectional interactions between antigen-bearing respiratory tract dendritic cells (DCs) and T cells precede the late phase reaction in experimental asthma: DC activation occurs in the airway mucosa but not in the lung parenchyma. **2003.** J Exp Med 198:19-30.
- Hunninghake, G. M.**, Soto-Quiros, M. E., Avila, L., Su, J., Murphy, A., Demeo, D. L., Ly, N. P., Liang, C., Sylvia, J. S., Klanderman, B. J., Lange, C., Raby, B. A., Silverman, E. K., and Celedon, J. C. Polymorphisms in IL13, total IgE, eosinophilia, and asthma exacerbations in childhood. **2007.** J Allergy Clin Immunol 120:84-90.
- Ibanez, de Caceres, I.**, Dulaimi, E., Hoffman, A. M., Al Saleem, T., Uzzo, R. G., and Cairns, P. Identification of novel target genes by an epigenetic reactivation screen of renal cancer. **2006.** Cancer Res. 66:5021-5028.
- Iguchi-Ariga, S. M. and Schaffner, W.** CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. **1989.** Genes Dev. 3:612-619.
- Issa, J. P.** Optimizing therapy with methylation inhibitors in myelodysplastic syndromes: dose, duration, and patient selection. **2005.** Nat.Clin Pract.Oncol. 2 Suppl 1:S24-S29.
- Iwamoto, I.**, Nakajima, H., Endo, H., and Yoshida, S. Interferon gamma regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD4+ T cells . **1993.** J Exp Med 177:573-576.

- Jaenisch, R. and Bird, A.** Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **2003.** *Nat.Genet* 33 Suppl:245-254.
- Jain, V. V.,** Kitagaki, K., Businga, T., Hussain, I., George, C., O'shaughnessy, P., and Kline, J. N. CpG-oligodeoxynucleotides inhibit airway remodeling in a murine model of chronic asthma. **2002.** *J Allergy Clin Immunol* 110:867-872.
- Janson, P. C.,** Winerdal, M. E., and Winqvist, O. At the crossroads of T helper lineage commitment-Epigenetics points the way. **2009.** *Biochim.Biophys.Acta* 1790:906-919.
- Jarvis, D.,** Chinn, S., Luczynska, C., and Burney, P. The association of family size with atopy and atopic disease. **1997.** *Clin Exp Allergy* 27:240-245.
- Jirtle, R. L. and Skinner, M. K.** Environmental epigenomics and disease susceptibility. **2007.** *Nat.Rev Genet* 8:253-262.
- Johansson, S. G.,** Hourihane, J. O., Bousquet, J., Bruijnzeel-Koomen, C., Dreborg, S., Haahtela, T., Kowalski, M. L., Mygind, N., Ring, J., van Cauwenberge, P., Hage-Hamsten, M., and Wuthrich, B. A revised nomenclature for allergy. An EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. **2001.** *Allergy* 56:813-824.
- Jones, B. and Chen, J.** Inhibition of IFN-gamma transcription by site-specific methylation during T helper cell development. **2006.** *EMBO J* 25:2443-2452.
- Jones, C. A.,** Holloway, J. A., and Warner, J. O. Does atopic disease start in foetal life? **2000.** *Allergy* 55:2-10.
- Jones, P. A. and Baylin, S. B.** The fundamental role of epigenetic events in cancer. **2002.** *Nat.Rev Genet* 3:415-428.
- Jones, P. L.,** Veenstra, G. J., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., Strouboulis, J., and Wolffe, A. P. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. **1998.** *Nat.Genet* 19:187-191.
- Juttermann, R.,** Li, E., and Jaenisch, R. Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. **1994.** *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 91:11797-11801.
- Karimi, M.,** Johansson, S., and Ekstrom, T. J. Using LUMA: a Luminometric-based assay for global DNA-methylation. **2006.** *Epigenetics*. 1:45-48.
- Kass, S. U.,** Landsberger, N., and Wolffe, A. P. DNA methylation directs a time-dependent repression of transcription initiation. **1997.** *Curr.Biol.* 7:157-165.
- Kearley, J.,** Barker, J. E. , Robinson, D. S., and Lloyd, C. M. Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent. **2005.** *J Exp Med* 202:1539-1547.
- Kearley, J.,** Robinson, D. S., and Lloyd, C. M. CD4+CD25+ regulatory T cells reverse established allergic airway inflammation and prevent airway remodeling. **2008.** *J Allergy Clin Immunol* 122:617-624.
- Kim, S. T.,** Fields, P. E., and Flavell, R. A. Demethylation of a specific hypersensitive site in the Th2 locus control region. **2007.** *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 104:17052-17057.
- Klinman, D. M.** Immunotherapeutic uses of CpG oligodeoxynucleotides. **2004.** *Nat.Rev Immunol* 4:249-258.

- Korthals, M.,** Ege, M. J., Tebbe, C. C., von Mutius, E., and Bauer, J. Application of PCR-SSCP for molecular epidemiological studies on the exposure of farm children to bacteria in environmental dust. **2008.** *J Microbiol.Methods* 73:49-56.
- Koyanagi, M.,** Baguet, A., Martens, J., Margueron, R., Jenuwein, T., and Bix, M. EZH2 and histone 3 trimethyl lysine 27 associated with Il4 and Il13 gene silencing in Th1 cells. **2005.** *J Biol.Chem.* 280:31470-31477.
- Kulig, M.,** Bergmann, R., Niggemann, B., Burow, G., and Wahn, U. Prediction of sensitization to inhalant allergens in childhood: evaluating family history, atopic dermatitis and sensitization to food allergens. The MAS Study Group. Multicentre Allergy Study. **1998.** *Clin Exp Allergy* 28:1397-1403.
- Kwon, N. H.,** Kim, J. S., Lee, J. Y., Oh, M. J., and Choi, D. C. DNA methylation and the expression of IL-4 and IFN-gamma promoter genes in patients with bronchial asthma. **2008.** *J Clin Immunol* 28:139-146.
- Lack, G.,** Renz, H., Saloga, J., Bradley, K. L., Loader, J., Leung, D. Y., Larsen, G., and Gelfand, E. W. Nebulized but not parenteral IFN-gamma decreases IgE production and normalizes airways function in a murine model of allergen sensitization. **1994.** *J Immunol* 152:2546-2554.
- Lambrecht, B. N. and Hammad, H.** Biology of lung dendritic cells at the origin of asthma. **2009.** *Immunity* 31:412-424.
- Lantry, L. E.,** Zhang, Z., Crist, K. A., Wang, Y., Kelloff, G. J., Lubet, R. A., and You, M. 5-Aza-2'-deoxycytidine is chemopreventive in a 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced primary mouse lung tumor model. **1999.** *Carcinogenesis* 20:343-346.
- Lau, S.,** Nickel, R., Niggemann, B., Gruber, C., Sommerfeld, C., Illi, S. , Kulig, M., Forster, J. , Wahn, U., Groeger, M., Zepp, F., Kamin, W., Bieber, I., Tacke, U., Wahn, V., Bauer, C. P., Bergmann, R., and von Mutius, E. The development of childhood asthma: lessons from the German Multicentre Allergy Study (MAS). **2002.** *Paediatr.Respir Rev* 3:265-272.
- Lee, D. U.,** Agarwal, S., and Rao, A. Th2 lineage commitment and efficient IL-4 production involves extended demethylation of the IL-4 gene. **2002.** *Immunity* 16:649-660.
- Lee, D. U.,** Avni, O., Chen, L., and Rao, A. A distal enhancer in the interferon-gamma (IFN-gamma) locus revealed by genome sequence comparison. **2004.** *J Biol.Chem.* 279:4802-4810.
- Lee, G. R.,** Fields, P. E., and Flavell, R. A. Regulation of IL-4 gene expression by distal regulatory elements and GATA-3 at the chromatin level. **2001.** *Immunity* 14:447-459.
- Lee, G. R.,** Spilianakis, C. G., and Flavell, R. A. Hypersensitive site 7 of the TH2 locus control region is essential for expressing TH2 cytokine genes and for long-range intrachromosomal interactions. **2005.** *Nat.Immunol* 6:42-48.
- Lee, H. J.,** Takemoto, N., Kurata, H., Kamogawa, Y. , Miyatake, S., O'Garra, A., and Arai, N. GATA-3 induces T helper cell type 2 (Th2) cytokine expression and chromatin remodeling in committed Th1 cells. **2000.** *J Exp Med* 192:105-115.
- Lee, P. P.,** Fitzpatrick, D. R., Beard, C., Jessup, H. K., Lehar, S., Makar, K. W., Perez-Melgosa, M., Sweetser, M. T., Schlissel, M. S., Nguyen, S., Cherry, S. R., Tsai, J. H., Tucker, S. M., Weaver, W. M., Kelso, A., Jaenisch, R., and Wilson, C. B. A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival. **2001.** *Immunity* 15:763-774.
- Leff, A. R.** Inflammatory mediation of airway hyperresponsiveness by peripheral blood granulocytes. The case for the eosinophil. **1994.** *Chest* 106:1202-1208.

- Lei, H.**, Oh, S. P., Okano, M., Juttermann, R., Goss, K. A., Jaenisch, R., and Li, E. De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. **1996.** *Development* 122:3195-3205.
- Levine, S. J.** Bronchial epithelial cell-cytokine interactions in airway inflammation. **1995.** *J Investig.Med* 43:241-249.
- Li, C. R.**, Santoso, S., and Lo, D. D. Quantitative analysis of T cell homeostatic proliferation. **2007.** *Cell Immunol* 250:40-54.
- Li, E.**, Bestor, T. H., and Jaenisch, R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. **1992.** *Cell* 69:915-926.
- Li, X. M.**, Chopra, R. K., Chou, T. Y., Schofield, B. H., Wills-Karp, M., and Huang, S. K. Mucosal IFN-gamma gene transfer inhibits pulmonary allergic responses in mice. **1996.** *J Immunol* 157:3216-3219.
- Liu, J.**, Ballaney, M., Al alem, U., Quan, C., Jin, X., Perera, F., Chen, L. C., and Miller, R. L. Combined inhaled diesel exhaust particles and allergen exposure alter methylation of T helper genes and IgE production in vivo. **2008.** *Toxicol Sci* 102:76-81.
- Locksley, R. M.** Th2 cells: help for helminths. **1994.** *J Exp Med* 179:1405-1407.
- Lohoff, M. and Mak, T. W.** Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation. **2005.** *Nat.Rev Immunol* 5:125-135.
- Loots, G. G.**, Locksley, R. M., Blankespoor, C. M., Wang, Z. E., Miller, W., Rubin, E. M., and Frazer, K. A. Identification of a coordinate regulator of interleukins 4, 13, and 5 by cross-species sequence comparisons. **2000.** *Science* 288:136-140.
- Magnusson, L. L.**, Olesen, A. B., Wennborg, H., and Olsen, J. Wheezing, asthma, hayfever, and atopic eczema in childhood following exposure to tobacco smoke in fetal life. **2005.** *Clin Exp Allergy* 35:1550-1556.
- Mantelingu, K.**, Reddy, B. A., Swaminathan, V., Kishore, A. H., Siddappa, N. B., Kumar, G. V., Nagashankar, G., Natesh, N., Roy, S., Sadhale, P. P., Ranga, U., Narayana, C., and Kundu, T. K. Specific inhibition of p300-HAT alters global gene expression and represses HIV replication. **2007.** *Chem.Biol.* 14:645-657.
- Margueron, R.**, Trojer, P., and Reinberg, D. The key to development: interpreting the histone code? **2005.** *Curr.Opin.Genet Dev.* 15:163-176.
- Marone, G.** Asthma: recent advances. **1998.** *Immunol Today* 19:5-9.
- Marsh, D. G.**, Neely, J. D. , Breazeale, D. R., Ghosh, B., Freidhoff, L. R., Ehrlich-Kautzky, E., Schou, C., Krishnaswamy, G., and Beaty, T. H. Linkage analysis of IL4 and other chromosome 5q31.1 markers and total serum immunoglobulin E concentrations. **1994.** *Science* 264:1152-1156.
- Martino, D. J. and Prescott, S. L.** Silent mysteries: epigenetic paradigms could hold the key to conquering the epidemic of allergy and immune disease. **2010.** *Allergy* 65:7-15.
- Maziak, W.**, Behrens, T., Brasky, T. M., Duhme, H., Rzehak, P., Weiland, S. K., and Keil, U. Are asthma and allergies in children and adolescents increasing? Results from ISAAC phase I and phase III surveys in Munster, Germany. **2003.** *Allergy* 58:572-579.
- McKenzie, A. N.** Regulation of T helper type 2 cell immunity by interleukin-4 and interleukin-13. **2000.** *Pharmacol.Ther.* 88:143-151.

- Mellman, I. and Steinman, R. M.** Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. **2001.** *Cell* 106:255-258.
- Melvin, A. J.,** McGurn, M. E., Bort, S. J., Gibson, C., and Lewis, D. B. Hypomethylation of the interferon-gamma gene correlates with its expression by primary T-lineage cells. **1995.** *Eur.J Immunol* 25:426-430.
- Michalowsky, L. A. and Jones, P. A.** Differential nuclear protein binding to 5-azacytosine-containing DNA as a potential mechanism for 5-aza-2'-deoxycytidine resistance. **1987.** *Mol Cell Biol.* 7:3076-3083.
- Moffatt, M. F.,** Schou, C., Faux, J. A., and Cookson, W. O. Germline TCR-A restriction of immunoglobulin E responses to allergen. **1997.** *Immunogenetics* 46:226-230.
- Moffatt, M. F.,** Kabesch, M., Liang, L., Dixon, A. L., Strachan, D., Heath, S., Depner, M., von Berg, A., Bufe, A., Rietschel, E., Heinzmann, A., Simma, B., Frischer, T., Willis-Owen, S. A., Wong, K. C., Illig, T., Vogelberg, C., Weiland, S. K., von Mutius, E., Abecasis, G. R., Farrall, M., Gut, I. G., Lathrop, G. M., and Cookson, W. O. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. **2007.** *Nature* 448:470-473.
- Mohrs, M.,** Blankespoor, C. M., Wang, Z. E., Loots, G. G., Afzal, V., Hadeiba, H., Shinkai, K., Rubin, E. M., and Locksley, R. M. Deletion of a coordinate regulator of type 2 cytokine expression in mice. **2001.** *Nat.Immunol* 2:842-847.
- Mosmann, T. R. and Sad, S.** The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **1996.** *Immunol Today* 17:138-146.
- Murphy, K. M. and Reiner, S. L.** The lineage decisions of helper T cells. **2002.** *Nat.Rev Immunol* 2:933-944.
- Nakajima, H. and Takatsu, K.** Role of cytokines in allergic airway inflammation. **2007.** *Int Arch Allergy Immunol* 142:265-273.
- Nakanishi, K.,** Yoshimoto, T., Chu, C. C., Matsumoto, H., Hase, K., Nagai, N., Tanaka, T., Miyasaka, M., Paul, W. E., and Shinka, S. IL-2 inhibits IL-4-dependent IgE and IgG1 production in vitro and in vivo. **1995.** *Int Immunol* 7:259-268.
- O'Garra, A. and Arai, N.** The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. **2000.** *Trends Cell Biol.* 10:542-550.
- Ober, C. and Moffatt, M. F.** Contributing factors to the pathobiology. The genetics of asthma. **2000.** *Clin Chest Med* 21:245-261.
- Ober, C. and Hoffjan, S.** Asthma genetics 2006: the long and winding road to gene discovery. **2006.** *Genes Immun.* 7:95-100.
- Ouyang, W.,** Lohning, M., Gao, Z., Assenmacher, M., Ranganath, S., Radbruch, A., and Murphy, K. M. Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. **2000.** *Immunity* 12:27-37.
- Ozdemir, C.,** Sel, S., Scholl, I., Yildirim, A. O. , Bluemer, N., Garn, H., Ackermann, U., Wegmann, M., Barlan, I. B., Renz, H., and Sel, S. CD4+ T cells from mice with intestinal immediate-type hypersensitivity induce airway hyperreactivity. **2007.** *Clin Exp Allergy* 37:1419-1426.

- Palii, S. S.,** Van Emburgh, B. O., Sankpal, U. T., Brown, K. D., and Robertson, K. D. DNA methylation inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine induces reversible genome-wide DNA damage that is distinctly influenced by DNA methyltransferases 1 and 3B. **2008.** *Mol Cell Biol.* 28:752-771.
- Pan, Y. and Sawalha, A. H.** Epigenetic regulation and the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. **2009.** *Transl.Res.* 153:4-10.
- Pearce, N.,** Ait-Khaled, N. , Beasley, R., Mallol, J., Keil, U., Mitchell, E., and Robertson, C. Worldwide trends in the prevalence of asthma symptoms: phase III of the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). **2007.** *Thorax* 62:758-766.
- Pene, J.,** Rousset, F., Briere, F., Chretien, I., Bonnefoy, J. Y., Spits, H., Yokota, T., Arai, N. , Arai, K., Banchereau, J.,. IgE production by normal human lymphocytes is induced by interleukin 4 and suppressed by interferons gamma and alpha and prostaglandin E2. **1988.** *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 85:6880-6884.
- Perera, F.,** Tang, W. Y., Herbstman, J., Tang, D., Levin, L., Miller, R., and Ho, S. M. Relation of DNA methylation of 5'-CpG island of ACSL3 to transplacental exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and childhood asthma. **2009.** *PLoS.One.* 4:e4488.
- Pfefferle, P. I.,** Buchele, G., Blumer, N., Roponen, M., Ege, M. J., Krauss-Etschmann, S., Genuneit, J., Hyvarinen, A., Hirvonen, M. R., Lauener, R., Pekkanen, J., Riedler, J., Dalphin, J. C. , Brunekeef, B., Braun-Fahrlander, C., von Mutius, E., and Renz, H. Cord blood cytokines are modulated by maternal farming activities and consumption of farm dairy products during pregnancy: The PASTURE Study. **2010.** *J Allergy Clin Immunol* 125:108-115.
- Polansky, J. K.,** Kretschmer, K., Freyer, J., Floess, S., Garbe, A., Baron, U., Olek, S., Hamann, A., von Boehmer, H., and Huehn, J. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. **2008.** *Eur.J Immunol* 38:1654-1663.
- Prescott, S. L. and Bjorksten, B.** Probiotics for the prevention or treatment of allergic diseases. **2007.** *J Allergy Clin Immunol* 120:255-262.
- Rabe, K. F.,** Munoz, N. M., Vita, A. J., Morton, B. E., Magnussen, H., and Leff, A. R. Contraction of human bronchial smooth muscle caused by activated human eosinophils. **1994.** *Am J Physiol* 267:L326-L334 .
- Rengarajan, J.,** Szabo, S. J., and Glimcher, L. H. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. **2000.** *Immunol Today* 21:479-483.
- Riedler, J.,** Eder, W., Oberfeld, G., and Schreuer, M. Austrian children living on a farm have less hay fever, asthma and allergic sensitization. **2000.** *Clin Exp Allergy* 30:194-200.
- Riedler, J.,** Braun-Fahrlander, C., Eder, W., Schreuer, M., Waser, M., Maisch, S., Carr, D., Schierl, R., Nowak, D., and von Mutius, E. Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. **2001.** *Lancet* 358:1129-1133.
- Robinson, D. S.,** Hamid, Q. , Ying, S., Tsicopoulos, A., Barkans, J., Bentley, A. M., Corrigan, C., Durham, S. R., and Kay, A. B. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. **1992.** *N.Engl.J Med* 326:298-304.
- Romagnani, S.** The Th1/Th2 paradigm. **1997.** *Immunol Today* 18:263-266.
- Romagnani, S.** The role of lymphocytes in allergic disease. **2000.** *J Allergy Clin Immunol* 105:399-408.

- Ronmark, E.,** Lundback, B., Jonsson, E., Jonsson, A. C., Lindstrom, M., and Sandstrom, T. Incidence of asthma in adults--report from the Obstructive Lung Disease in Northern Sweden Study. **1997.** *Allergy* 52:1071-1078.
- Rose, S.,** Lichtenheld, M., Foote, M. R., and Adkins, B. Murine neonatal CD4+ cells are poised for rapid Th2 effector-like function. **2007.** *J Immunol* 178:2667-2678.
- Rountree, M. R.** and Selker, E. U. DNA methylation inhibits elongation but not initiation of transcription in *Neurospora crassa*. **1997.** *Genes Dev.* 11:2383-2395.
- Rowe, J.,** Heaton, T., Kusel, M., Suriyaarachchi, D., Serralha, M., Holt, B. J., de Klerk, N., Sly, P. D., and Holt, P. G. High IFN-gamma production by CD8+ T cells and early sensitization among infants at high risk of atopy. **2004.** *J Allergy Clin Immunol* 113:710-716.
- Schoenborn, J. R.,** Dorschner, M. O., Sekimata, M., Santer, D. M., Shnyreva, M., Fitzpatrick, D. R., Stamatoyannopoulos, J. A., and Wilson, C. B. Comprehensive epigenetic profiling identifies multiple distal regulatory elements directing transcription of the gene encoding interferon-gamma. **2007.** *Nat.Immunol* 8:732-742.
- Schubeler, D.,** Lorincz, M. C., Cimbora, D. M., Telling, A., Feng, Y. Q., Bouhassira, E. E., and Groudine, M. Genomic targeting of methylated DNA: influence of methylation on transcription, replication, chromatin structure, and histone acetylation. **2000.** *Mol Cell Biol.* 20:9103-9112.
- Sepp, E.,** Naaber, P., Voor, T., Mikelsaar, M., and Bjorksten, B. Development of intestinal microflora during the first month of life in Estonian and Swedish infants. **2000.** *Micr Ecol Health Dis* 12:22-26.
- Shnyreva, M.,** Weaver, W. M., Blanchette, M., Taylor, S. L., Tompa, M., Fitzpatrick, D. R., and Wilson, C. B. Evolutionarily conserved sequence elements that positively regulate IFN-gamma expression in T cells. **2004.** *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 101:12622-12627.
- Sigalotti, L.,** Fratta, E., Coral, S., Cortini, E., Covre, A., Nicolay, H. J., Anzalone, L., Pezzani, L., Di Giacomo, A. M., Fonsatti, E., Colizzi, F., Altomonte, M., Calabro, L., and Maio, M. Epigenetic drugs as pleiotropic agents in cancer treatment: biomolecular aspects and clinical applications. **2007.** *J Cell Physiol* 212:330-344.
- Sjogren, Y. M.,** Jenmalm, M. C., Bottcher, M. F., Bjorksten, B., and Sverremark-Ekstrom, E. Altered early infant gut microbiota in children developing allergy up to 5 years of age. **2009.** *Clin Exp Allergy* 39:518-526.
- Skadhauge, L. R.,** Christensen, K., Kyvik, K. O., and Sigsgaard, T. Genetic and environmental influence on asthma: a population-based study of 11,688 Danish twin pairs. **1999.** *Eur.Respir J* 13:8-14.
- Smale, S. T. and Fisher, A. G.** Chromatin structure and gene regulation in the immune system. **2002.** *Annu.Rev Immunol* 20:427-462.
- Stenvinkel, P.,** Karimi, M. , Johansson, S., Axelsson, J., Suliman, M., Lindholm, B., Heimbürger, O., Barany, P., Alvestrand, A., Nordfors, L., Qureshi, A. R., Ekstrom, T. J., and Schalling, M. Impact of inflammation on epigenetic DNA methylation - a novel risk factor for cardiovascular disease? **2007.** *J Intern.Med* 261:488-499.
- Stirling, R. G. and Chung, K. F.** New immunological approaches and cytokine targets in asthma and allergy. **2000.** *Eur.Respir J* 16:1158-1174.
- Strachan, D. P.** Hay fever, hygiene, and household size. **1989.** *BMJ* 299:1259-1260.

- Strachan, D. P.** Family size, infection and atopy: the first decade of the "hygiene hypothesis". **2000.** Thorax 55 Suppl 1:S2-10.
- Strahl, B. D. and Allis, C. D.** The language of covalent histone modifications. **2000.** Nature 403:41-45.
- Stresemann, C.,** Brueckner, B., Musch, T., Stopper, H., and Lyko, F. Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines. **2006.** Cancer Res. 66:2794-2800.
- Takemoto, N.,** Koyano-Nakagawa, N., Yokota, T., Arai, N., Miyatake, S., and Arai, K. Th2-specific DNase I-hypersensitive sites in the murine IL-13 and IL-4 intergenic region. **1998.** Int Immunol 10:1981-1985.
- Thu, K. L.,** Pikor, L. A., Kennett, J. Y., Alvarez, C. E., and Lam, W. L. Methylation analysis by DNA immunoprecipitation. **2010.** J Cell Physiol 222:522-531.
- Tost, J. and Gut, I. G.** DNA methylation analysis by pyrosequencing. **2007.** Nat.Protoc. 2:2265-2275.
- Trojer, P. and Reinberg, D.** Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? **2007.** Mol Cell 28:1-13.
- Urdinguio, R. G.,** Sanchez-Mut, J. V., and Esteller, M. Epigenetic mechanisms in neurological diseases: genes, syndromes, and therapies. **2009.** Lancet Neurol. 8:1056-1072.
- Vaissiere, T.,** Sawan, C., and Herceg, Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. **2008.** Mutat.Res. 659:40-48.
- Valenta, R.** The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. **2002.** Nat.Rev Immunol 2:446-453.
- van der Maarel, S. M.** Epigenetic mechanisms in health and disease. **2008.** Ann.Rheum.Dis. 67 Suppl 3:iii97-100.
- Vermaelen, K. and Pauwels, R.** Accelerated airway dendritic cell maturation, trafficking, and elimination in a mouse model of asthma. **2003.** Am J Respir Cell Mol Biol. 29:405-409.
- Vignola, A. M.,** Merendino, A. M., Chiappara, G., Chanez, P., Pace, E., Siena, L., Profita, M., Bousquet, J., and Bonsignore, G. Markers of acute airway inflammation. **1997.** Monaldi Arch Chest Dis. 52:83-85.
- Vignola, A. M.,** Mirabella, F., Costanzo, G., Di Giorgi, R., Gjomarkaj, M., Bellia, V., and Bonsignore, G. Airway remodeling in asthma. **2003.** Chest 123:417S-422S.
- von Mutius, E.,** Martinez, F. D., Fritzsche, C., Nicolai, T., Roell, G., and Thiemann, H. H. Prevalence of asthma and atopy in two areas of West and East Germany. **1994.** Am J Respir Crit Care Med 149:358-364.
- von Mutius, E.,** Martinez, F. D., Fritzsche, C., Nicolai, T., Reitmeir, P., and Thiemann, H. H. Skin test reactivity and number of siblings. **1994.** BMJ 308:692-695.
- von Mutius, E.,** Weiland, S. K., Fritzsche, C., Duhme, H., and Keil, U. Increasing prevalence of hay fever and atopy among children in Leipzig, East Germany . **1998.** Lancet 351 :862-866.
- von Mutius, E.,** Braun-Fahrlander, C., Schierl, R., Riedler, J., Ehlermann, S., Maisch, S., Waser, M., and Nowak, D. Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. **2000.** Clin Exp Allergy 30:1230-1234.

- von Mutius, E.** Asthma and allergies in rural areas of Europe. **2007.** *Proc.Am Thorac.Soc* 4:212-216.
- von Mutius, E. and le Souef, P. N.** Early gene-environment interactions: can they inform primary preventive strategies for asthma? **2007.** *Semin.Respir Crit Care Med* 28:255-263.
- von Mutius, E.** Allergies, infections and the hygiene hypothesis--the epidemiological evidence. **2007.** *Immunobiology* 212:433-439.
- von Mutius, E.** Gene-environment interactions in asthma. **2009.** *J Allergy Clin Immunol* 123:3-11.
- Wahn, U.,** Lau, S., Bergmann, R., Kulig, M., Forster, J., Bergmann, K., Bauer, C. P., and Guggenmoos-Holzmann, I. Indoor allergen exposure is a risk factor for sensitization during the first three years of life. **1997.** *J Allergy Clin Immunol* 99:763-769.
- Wehbe, H.,** Henson, R., Meng, F., Mize-Berge, J., and Patel, T. Interleukin-6 contributes to growth in cholangiocarcinoma cells by aberrant promoter methylation and gene expression. 2006. *Cancer Res.* 66:10517-10524
- Weisenberger, D. J.,** Velicescu, M., Cheng, J. C., Gonzales, F. A., Liang, G., and Jones, P. A. Role of the DNA methyltransferase variant DNMT3b3 in DNA methylation. **2004.** *Mol Cancer Res.* 2:62-72.
- White, G. P.,** Watt, P. M., Holt, B. J., and Holt, P. G. Differential patterns of methylation of the IFN-gamma promoter at CpG and non-CpG sites underlie differences in IFN-gamma gene expression between human neonatal and adult CD. **2002.** *J Immunol* 168:2820-2827.
- White, G. P.,** Hollams, E. M., Yerkovich, S. T., Bosco, A., Holt, B. J., Bassami, M. R., Kusel, M., Sly, P. D., and Holt, P. G. CpG methylation patterns in the IFNgamma promoter in naive T cells: variations during Th1 and Th2 differentiation and between atopics and non-atopics. **2006.** *Pediatr.Allergy Immunol* 17:557-564.
- Wills-Karp, M.,** Luyimbazi, J., Xu, X., Schofield, B., Neben, T. Y., Karp, C. L., and Donaldson, D. D. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. **1998.** *Science* 282:2258-2261.
- Wills-Karp, M. and Ewart, S. L.** Time to draw breath: asthma-susceptibility genes are identified. **2004.** *Nat.Rev Genet* 5:376-387.
- Wills-Karp, M.** Interleukin-13 in asthma pathogenesis. **2004.** *Immunol Rev* 202:175-190.
- Wilson, C. B.,** Rowell, E., and Sekimata, M. Epigenetic control of T-helper-cell differentiation. 2009. *Nat.Rev Immunol* 9:91-105.
- Winders, B. R.,** Schwartz, R. H., and Bruniquel, D. A distinct region of the murine IFN-gamma promoter is hypomethylated from early T cell development through mature naive and Th1 cell differentiation, but is hypermethylated in Th2 cells. **2004.** *J Immunol* 173:7377-7384.
- Wise, J. T.,** Baginski, T. J., and Mobley, J. L. An adoptive transfer model of allergic lung inflammation in mice is mediated by CD4+CD62LlowCD25+ T cells. **1999.** *J Immunol* 162:5592-5600.
- Yang, A. S.,** Doshi, K. D., Choi, S. W., Mason, J. B., Mannari, R. K., Gharybian, V., Luna, R., Rashid, A., Shen, L., Estecio, M. R., Kantarjian, H. M., Garcia-Manero, G., and Issa, J. P. DNA methylation changes after 5-aza-2'-deoxycytidine therapy in patients with leukemia. **2006.** *Cancer Res.* 66:5495-5503.

Yang, S. R., Valvo, S., Yao, H., Kode, A., Rajendrasozhan, S., Edirisinghe, I., Caito, S., Adenuga, D., Henry, R., Fromm, G., Maggirwar, S., Li, J. D., Bulger, M., and Rahman, I. IKK alpha causes chromatin modification on pro-inflammatory genes by cigarette smoke in mouse lung. **2008.** *Am J Respir Cell Mol Biol.* 38:689-698.

Young, H. A., Ghosh, P., Ye, J., Lederer, J., Lichtman, A., Gerard, J. R. , Penix, L., Wilson, C. B., Melvin, A. J., McGurn, M. E., and . Differentiation of the T helper phenotypes by analysis of the methylation state of the IFN-gamma gene. **1994.** *J Immunol* 153:3603-3610.

Zhou, L., Chong, M. M., and Littman, D. R. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. **2009.** *Immunity* 30:646-655.

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
5Aza	5-Aza-2'-Deoxycytidin
A	Adenosin
<i>A. lwoffii</i> F78	<i>Acinetobacter lwoffii</i> F78
Abb.	Abbildung
ac	Acetyliert
AK	Antikörper
Al(OH) ₃	Aluminiumhydroxid
ALEX	Allergien und Endotoxin
Alum	Aluminiumhydroxid
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ATF	Aktivierender Transkriptionsfaktor
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	Broncho-alveoläre Lavage
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
C5	5. Kohlenstoff-Atom
C	Cytosin
CCP	Charge-coupled Device
CD	Cluster of Diffentiation
cDNA	copy DNA
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CFU	Koloniebildende Einheit
ChIP	Chromatin-Immuno-Präzipitation
CNS	Conserved Noncoding Sequence
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
CREB	cAMP Response Element-Binding Protein
dATP	Deoxyadenosin Triphosphat
DC	Dendritische Zelle
dCTP	Deoxycytidin Triphosphat
dGTP	Deoxyguanosin Triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferasen
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DOC	Natriumdeoxycholat
dTTP	Deoxythymidinn Triphosphat
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbant Assay
EPR	Expert Panel Report
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
Fc	Fragment crystalline
FcεR	IgE-Rezeptor

FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoreszein-Isothyocyanat
g	Gramm
G	Guanin
GAPDH	Glyzerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
gDNA	genomische DNA
GINA	Globale Initiative für Asthma
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
H	Histon
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HAT	Histonacetyltrasferasen
HDAC	Histondeacetylasen
HE	Hämotoxilin-Eosin
IP	Immunpräzipitation
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFN γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP	Immunopräzipitation
ISAAC	International Study of Asthma and Allergies in Childhood
K	Lysin
kg	Kilogramm
L	Liter
λ	Wellenlänge
LCR	Locus Control Region
LGL	Large Granular Leukemia
LiCl	Lithiumchlorid
LK	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid
LUMA	Luminometric Methylation Assay
m	Milli
M	Molar
MACS	Magnetic Cell Sorting
MBD	Methyl-CpG-Binde-Domäne
MBP	Major-Basic-Protein
MCh	Methacholin
me	Methyliert
Mg	Magnesium
MHC	Haupt-Histokompatibilitätskomplex
min	Minuten
MNC	Mononukleäre Zelle
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid

NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natronlauge
nm	nanometer
OVA	Ovalbumin
p	Wahrscheinlichkeit
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PAS	Periodsäure-Schiff
PASTURE	Protection against Allergy: Study in Rural Environments
PBS	Phosphate Bufferd Saline
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PE	Phycoerythrin
ph	phosphoryliert
POD	Peroxidase
PP _i	Pyrophosphat
qPCR	quantitative PCR
R	Arginin
RHS	Rad50 Hypersensitive Site
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Rosswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
S	Serin
s.	siehe
SCID	Severe-Combined-Immunodeficiency
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SFB/TR22	Sonderforschungsbereich Transregio 22
SNP	Single Nukleotid Polymorphismus
sog.	sogenannt
su	sumoyliert
T	Threonin
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCR	T-Zell-Rezeptor
tg	Transgen
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
Treg	regulatorische T-Zelle
TSA	Trichostatin A
TSC22	TGF-β stimulated clone 22
TSS	Transkriptionsstart
ub	ubiquityliert
UV	Ultraviolett
V	Volt
VE	voll entmineralisiert
vs.	versus
WT	Wildtyp

8 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

8.1 Abbildungen

Abb. 1.1	Sensibilisierungsphase (modifiziert nach Valenta 2002)	10
Abb. 1.2	Sofortreaktion (modifiziert nach Valenta 2002, Galli 2008)	11
Abb. 1.3	Spätreaktion (modifiziert nach Valenta 2002, Galli 2008)	12
Abb. 1.4	Prävalenz des Asthma bronchiale (Devereux 2006)	15
Abb. 1.5	Regulation der Transkription durch DNA-Methylierung (modifiziert nach Barros 2009)	20
Abb. 1.6	Chromatinstruktur (modifiziert nach Barnes 2005)	22
Abb. 1.7	Aufbau und Modifikationen des murinen IFN γ -Lokus (modifiziert nach Wilson 2009)	25
Abb. 1.8	Aufbau und Modifikationen des murinen Th2-Lokus (modifiziert nach Wilson 2009)	27
Abb. 2.1	Protokoll zur Induktion der allergischen Atemwegsentzündung	30
Abb. 2.2	Protokoll zur Modulation der allergischen Atemwegsentzündung mittels 5Aza	31
Abb. 2.3	Protokoll zum adoptiven Transfer von CD4 ⁺ -T-Zellen 5Aza behandelter Mäuse	32
Abb. 2.4	Protokoll zur pränatalen Immunmodulation durch Stallstaubbakterien	33
Abb. 2.5	Protokoll der anti-IFN γ - und Garcinol-Behandlung	33
Abb. 2.6	Prinzip der Pyrosequenzierung (modifiziert nach Ahmadian 2005)	48
Abb. 2.7	Prinzip LUMA (Karimi 2006)	53
Abb. 2.8	Prinzip: Chromatin-Immuno-Präzipitation (http://visiscience.com ; modifiziert)	54
Abb. 3.1	Zytotoxizität und Dosisfindung für 5Aza	65
Abb. 3.2	Keine Beeinflussung der Proliferationsfähigkeit von Immunzellen nach 5Aza-Behandlung <i>ex vivo</i>	66
Abb. 3.3	Keine Beeinflussung der Proliferationsfähigkeit von Immunzellen nach 5Aza-Behandlung <i>in vivo</i>	67
Abb. 3.4	Genomweite Demethylierung nach 5Aza-Behandlung	68
Abb. 3.5	5-Aza-2'-Deoxycytidinbehandlung verhindert die Ausbildung des asthmatischen Phänotyps im Tiermodell des experimentellen Asthmas	69
Abb. 3.6	5-Aza-2'-Deoxycytidinbehandlung verhindert inflammatorische Reaktion im Lungengewebe	70
Abb. 3.7	5-Aza-2'-Deoxycytidinbehandlung führt zu einer Veränderung der Th1/Th2-Balance in MNCs aus den LK der Lunge	71
Abb. 3.8	5-Aza-2'-Deoxycytidinbehandlung führt zu einer Veränderung der Th1/Th2-Balance in MNCs aus der Milz	72
Abb. 3.9	5-Aza-2'-Deoxycytidinbehandlung führt zu einem erhöhten Anteil OVA-spezifischer IgG2a-Antikörper, sowie zu einer Erniedrigung Th2-induzierter IgE- und IgG1-Antikörper	73
Abb. 3.10	5Aza beeinflusst Th1- und Th2-spezifische Genregionen unterschiedlich stark	74
Abb. 3.11	5Aza beeinflusst den IFN γ -Promotor (Th1) und CNS-1(Th2) unterschiedlich stark: Differenz zwischen PBS- und 5Aza-behandelten Tieren	75
Abb. 3.12	Migration der transferierten CD4 ⁺ -T-Zellen in die Lymphknoten der Lunge wird nicht durch 5Aza beeinflusst	76
Abb. 3.13	Verminderter asthmatischer Phänotyp nach adoptivem Transfer CD4 ⁺ -T-Zellen 5-Aza-2'-Deoxycytidin behandelter Tiere	78
Abb. 3.14	5-Aza-2'-Deoxycytidinbehandlung verhindert inflammatorische Reaktion im Lungengewebe nach Transfer CD4 ⁺ -T-Zellen	79
Abb. 3.15	5-Aza-2'-Deoxycytidinbehandlung führt zu Veränderung der Th1/Th2-Balance	80
Abb. 3.16	Veränderte Th1/Th2-Zytokinproduktion nach pränataler <i>A. lwoffii</i> F78-Exposition	82
Abb. 3.17	Keine Beeinflussung von Tregs nach pränataler <i>A. lwoffii</i> F78-Exposition	83
Abb. 3.18	Anti-IFN γ -Behandlung führt zur Wiederherstellung des asthmatischen Phänotyps	84
Abb. 3.19	Wiederherstellung der IL-5-Produktion von Milz-MNCs nach anti-IFN γ -Behandlung	85
Abb. 3.20	Unveränderte CpG-Methylierung am IFN γ -Promotor nach pränataler <i>A. lwoffii</i> F78-Exposition	86

Abb. 3.21	Pränatale <i>A. lwoffii</i> F78-Exposition führt zu einer erhöhten H4-Acetylierung am IFN γ -Promotor	87
Abb. 3.22	CpG-Methylierung des IL-4- und IL-5-Promotors sowie der Th2-regulatorischen Region CNS-1 nach pränataler <i>A. lwoffii</i> F78-Exposition	89
Abb. 3.23	Veränderte Histonmodifikationen am Th2-Lokus nach pränataler <i>A. lwoffii</i> F78-Exposition	90
Abb. 3.24	Keine Beeinflussung der Proliferationsfähigkeit von Immunzellen nach Garcinol-Behandlung <i>ex vivo</i>	92
Abb. 3.25	Keine Beeinflussung der Proliferationsfähigkeit von Immunzellen nach Garcinol-Behandlung <i>in vivo</i>	93
Abb. 3.26	Garcinol inhibiert erhöhte H4-Acetylierung am IFN γ -Promotor nach pränataler <i>A. lwoffii</i> F78-Exposition	94
Abb. 3.27	Erniedrigte IFN γ - und erhöhte IL-5-Produktion nach Garcinol-Behandlung von pränatal <i>A. lwoffii</i> F78-exponierten Mäusen	95
Abb. 3.28	Der Histon-Acetyltransferase-Inhibitor Garcinol führt zur Wiederherstellung des asthmatischen Phänotyps	96

8.2 Tabellen

Tab. 1.1	Chromatinmodifikationen	23
Tab. 2.1	AK-Konzentrationen und Verdünnungsfaktoren für Ig-ELISAs	39
Tab. 2.2	AK-Konzentrationen und Verdünnungsfaktoren für Zytokin-ELISAs	43
Tab. 2.3	ChIP-Primer	62
Tab. 2.4	Bisulfit-PCR-Primer	62
Tab. 2.5	Pyrosequenzier-Primer	62
Tab. 2.6	qPCR-Primer	62

9 VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren bzw. Privat-Dozenten in Marburg:

Bauer, Bernd, Dalpke, Daut, Eilers, Elsässer, Feußer, Garn, Garten, Gudermann, Hasilik, Hassel, Huber, Jacob, Jungclas, Kirchner, Klenk, Knöller, Koolmann, Kunz, Lang, Lill, Löffler, Lohoff, Lorberth, Moll, Müller, Renkawitz-Pohl, Renz, Röhm, Schäfer, Schulz, Schwarz, Voigt, Weihe, Westermann

10 PUBLIKATIONEN

- ⇒ Conrad, M.L.^{*}, Ferstl, R.^{*}, Teich, R.^{*}, **Brand, S.**, Blümer, N., Yildirim, A.Ö., Patrascan, C.C., Hanuszkiewicz, A., Akira, S., Wagner, H., Holst, O., von Mutius, E., Pfefferle, P.I., Kirschning, C.J.^{*}, Garn, H.^{*}, Renz, H.^{*}, Maternal TLR signaling is required for prenatal asthma protection by the nonpathogenic microbe *Acinetobacter lwoffii* F78, *J. Exp. Med.*, 206(13):2869-2877 (2009) (^{*} contributed equally)
- ⇒ Teich, R., Pfefferle, P.I., **Brand, S.**, Blümer, N., Conrad, M.L., Garn, H., Renz, H., Astma prevention in early life by stabe-derived *Acinetobacter lwoffii*. *Allergy & Clinical Immunolgy International - Journal of the World Allergy Organisation Proceedings of the 27th Symposium of the Colegium Intenational Allergologicum (in press)*
- ⇒ **Brand, S.**, Teich, R., Wittmann E.-M., Dicke, T., Yildirim, A.Ö., Schneider-Stock, R., Waterland, R.A., Bauer, U.-M., Garn, H., Pfefferle, P.I., Renz, H., Transmaternal asthma protection in the progeny by altered H4 acetylation at the *IFN γ* promoter (*in Bearbeitung*)
- ⇒ **Brand, S.**, Teich, R., Wittmann E.-M., Garn, H., Pfefferle, P.I., Renz, H., Inhibition of DNA methylation influences allergic sensitization and phenotype in an animal model of experimental asthma (*in Bearbeitung*)

Veröffentlichte Abstracts und Kongressbeiträge

- ⇒ **Brand, S.**, Teich, R., Pfefferle, P.I., Garn, H., Renz, H., Microbial-mediated asthma protection – methylation of the IFN γ promoter as a possible mechanism?, *Eur. J. Immunol.* 39(S1):S1-S808 (2009) – ECI 2009 in Berlin
- ⇒ **Brand, S.**, Teich, R., Conrad, M.L., Pfefferle, P.I., Garn, H., Renz, H., Microbial-mediated asthma protection: methylation of the IFN γ promoter as a possible mechanism, *Allergy* 64 (Suppl. 90):107 (2009) – EAACI 2009 in Warschau
- ⇒ Conrad, M.L., Teich, R., Ferstl, R., **Brand, S.**, Yildirim, A.Ö., Kirschning, C., Garn, H., Renz, H., Prenatal *Acinetobacter lwoffii* application induces asthma protective

effects in offspring that are dependent on functional maternal toll-like receptors, *Allergy* 64 (Suppl. 90):88 (2009) – EAACI 2009 in Warschau

- ⇒ **Brand, S.**, Teich, R., Conrad, M.L., Pfefferle, P.I., Garn, H., Renz, H. Methylierung des IFN γ -Promotors als möglicher Mechanismus mikrobiell vermittelter Asthma-Protektion, *Allergo J.*, 18(1) (2009) – Mainzer Allergie Workshop 2009
- ⇒ Conrad, M.L., Teich, R., Ferstl, R., **Brand, S.**, Yildirim, A.Ö., Kirschning, C., Garn, H., Renz, H., Asthma protective effects are induced by prenatal *Acinetobacter lwoffii* application and dependent on functional maternal toll-like receptors, *Allergo J.*, 18(1) (2009) – Mainzer Allergie Workshop 2009
- ⇒ Teich, R., **Brand, S.**, Blümer, N., Pfefferle, P.I., Garn, H., Renz, H., Epigenetic regulation of asthma preventive effects mediated by stable-derived bacteria, *J. Allergy Clin. Immunol.* 123(2) (2009) – Mainzer Allergie Workshop 2009
- ⇒ **Brand, S.**, Teich, R., Garn, H., Renz, H., Methylierung des IFN γ -Promotors als möglicher Mechanismus der Allergieprotektion durch *Acinetobacter lwoffii* F78, *Allergo J.*, 17(1) (2008) – Mainzer Allergie Workshop 2008

Weitere Publikationen:

- ⇒ Mrabet-Dahbi, S., Dalpke, A.H., Niebuhr, M., Frey, M., Draing, C., **Brand, S.**, Heeg, K., Werfel, T., Renz, H., The Toll-like receptor 2 R753Q mutation modifies cytokine production and Toll-like receptor expression in atopic dermatitis, *J. Allergy Clin. Immunol.* 121(4):1013-1019 (2007)

11 DANKSAGUNG

- ☞ Prof. Dr. Harald Renz möchte ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und die bereitwillige Diskussionsbereitschaft danken.
- ☞ Für die gute wissenschaftliche Betreuung, sowie für die kritische Durchsicht des Manuskripts, bedanke ich mich bei meinem Betreuer PD Dr. Holger Garn und natürlich auch bei Dr. Dr. Petra Pfefferle.
- ☞ Ein dickes Dankeschön geht an René Teich für die konstruktive Zusammenarbeit an der Epigenetik-Front und für die vielen „kreativen“ Pausen am Kaffeautomaten ;-).
- ☞ Ein weiteres dickes Dankeschön geht an Tanja Dicke, die sich, wie schon während der Diplomarbeit, nie über meine vielen „nervigen“ Fragen beschwert hat ☺, für die Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, sowie für die Durchsicht des Manuskripts. Und natürlich für die zahlreichen „Gelegenheiten“ ☺ bei denen ich meinen Frust bei ihr abladen konnte.
- ☞ Für solche netten Aktionen wie die „Eppendorf-Love-Story“, die ein wenig Ablenkung in den grauen Laboralltag gebracht hat, sei natürlich auch Eva-Maria Wittmann und Melanie Abram gedankt. Wenn es auch nicht für die Laborparty gereicht hat, so gab es doch wenigstens eine Torte mit 14 verschiedenen Geschmacksrichtungen. *g*
- ☞ Ein großer Dank betreffend der technischen Unterstützung geht an Lydia Lerch für die vielen ELISAs, die ich auf sie „abschieben“ durfte, sowie an Thomas Ruppertsberg, Sophia Bernhardt, Nicole Disser, Anja Spies-Naumann und unsere Azubis. Ein Dank auch an alle anderen Mitglieder der Arbeitsgruppe und des Instituts, die mir durch gute Zusammenarbeit und Ratschläge geholfen haben.
- ☞ Weiterhin sei auch Dr. Susanne Weber und Prof. Dr. Uta-Maria Bauer gedankt, mit deren Hilfe und Unterstützung die Etablierung des ChIP-Assays möglich war, sowie Prof. Michael Lohoff für den Vorschlag zur Bestimmung der *in vivo* Proliferation.
- ☞ Nina Bonekamp und Conny Ringer danke ich für die hin und wieder nötige Ablenkung und Zerstreuung in Form von Cocktail-, Ess-, Spiel-, und Billiard-Abenden während der Zeit des Studiums und der Doktorarbeit ☺. Und natürlich noch mal vielen Dank für das äußerst effektive Doktorarbeit-Zusammenschreib-Survival-Kit.
- ☞ Zu guter Letzt sei natürlich ganz herzlich meinen Eltern und meiner Familie gedankt, für die fortwährende Unterstützung während des gesamten Studiums.